

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Proteína quinasas del diptero *Ceratitis Capitata*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Amador Haro Ramos

DIRECTOR:

Ángel Martín Municio

Madrid, 2015

Amador Haro Ramos

TP
1981
113



x - 53 - 227345 - 0

PROTEINA QUINASAS DEL DIPTERO CERATITIS CAPITATA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Amador Haro Ramos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-13973-1981

Autor: AMADOR HARO RAMOS

PROTEINA QUINASAS DEL DIPTERO CERATITIS CAPITATA

Director: Prof. D. Angel Martín Municio
Catedrático-Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica

1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

PROTEINA QUINASAS DEL
DIPTERO CERATITIS CAPITATA

TESIS DOCTORAL
AMADOR HARO RAMOS

MADRID, ENERO 1981

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor D. Angel Martín Municio a quien va dirigido mi agradecimiento por su valiosa ayuda.

Deseo expresar mi agradecimiento a D. José Luis García López por su constante interés y colaboración. Mi agradecimiento también a Dña. Ma. Pilar Castellón Borreguero, D. Edgardo Catalán Tobar, D. José Ma. Fernández-Sousa Faro, Dña. Susana Periañez Fernández, Dña. Rosalía Rodríguez García y a todos aquellos miembros del Departamento que de una u otra forma han colaborado en la realización de este trabajo.

De igual forma quiero agradecer a Dña. Ma. Ascensión Jiménez Tebar y a D. César Gómez García su inestimable ayuda y colaboración.

III

I N D I C E

	<u>Página</u>
<u>1. INTRODUCCION</u>	1
1.1. Generalidades	2
1.2. Clasificación de las proteína quinasas	7
1.3. Proteína quinasas dependientes de cAMP (PQA)	9
1.3.1. Sistema cAMP-Proteína quinasa	9
1.3.2. Características moleculares	12
1.3.2.1. Estructura: subunidades y estequiometría. Mecanismos de activación	12
1.3.2.2. Isoenzimas: propiedades y distribución	16
1.3.3. Propiedades químicas	31
1.3.4. Reacción catalítica	32
1.3.4.1. Cinética	32
1.3.4.2. Especificidad de sustrato	36
1.3.5. Regulación	40
1.3.5.1. Acción hormonal y cAMP	40
1.3.5.2. Translocación	42
1.3.5.3. Regulación por Mg.ATP	43
1.3.5.4. Proteínas moduladoras	43

IV

	<u>Página</u>
1.3.5.5. Efecto de diversos sustratos y péptidos	
no sustratos	47
1.3.5.6. Efecto de las poliaminas	48
1.3.5.7. Acción de diversos agentes químicos y far	
macológicos	48
1.4. Proteína quinasas dependientes de cGMP (PQG).....	52
1.4.1. Sistema proteína quinasa-cGMP	52
1.4.2. Características moleculares: subunidades, este	
quiometria y mecanismo de activación	53
1.4.3. Distribución	57
1.4.4. Propiedades físicas e inmunológicas	58
1.4.5. Características de la unión de cGMP a PQG	59
1.4.6. Reacción catalítica	60
1.4.6.1. Cinética	60
1.4.6.2. Especificidad de sustrato	62
1.4.6.3. Autofosforilación	65
1.4.7. Activación de PQG "in vivo"	67
1.4.8. Proteína moduladora	68
1.4.9. Homología entre PQG y PQA	73
1.5. Proteína quinasas independientes de mensajero (PQI)	76
1.5.1. Características diferenciales de las proteína	
quinasas independientes	76
1.5.2. Estructura	78
1.5.3. Autofosforilación	79
1.5.4. Especificidad de sustrato	79
1.5.5. Regulación	80

	<u>Página</u>
1.5.6. Funcionalidad de las proteína quinasas indepen-	
dientes	80
1.6. Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}	82
1.7. Proteína quinasas dependientes de fosfolípidos y ac-	
tivadas por Ca^{2+}	83
1.8. Proteína quinasas dependientes de RNA de doble ban-	
da inducidas por el interferón	85
1.9. Sistema nucleótidos cíclicos-proteína quinasas en	
insectos	87
 <u>2. MATERIALES Y METODOS</u>	92
2.1. Material biológico	93
2.2. Medida de actividades enzimáticas	94
2.2.1. Ensayo de actividad de proteína quinasa	94
2.2.2. Ensayo de actividad ligante de cAMP y cGMP	95
2.2.3. Ensayo de actividad de fosfoproteína fosfatasa	97
2.3. Purificación de (γ - ^{32}P)ATP	97
2.4. Estudios preliminares de las actividades quinásicas	
y ligantes de nucleótidos cíclicos en distintas eta-	
pas del desarrollo	98
2.4.1. Extracción	98
2.4.2. Precipitación ácida	98
2.4.3. Precipitación con sulfato amónico	99
2.4.4. Diálisis	99
2.4.5. Cromatografías de adsorción (Biogel HTP)	100
2.4.6. Concentración	101

VI

	<u>Página</u>
2.4.7. Cromatografías de penetrabilidad (Sephadex G-200)	101
2.5. Proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble	101
2.5.1. Aislamiento y purificación	101
2.5.1.1. Extracción	103
2.5.1.2. Precipitación con sulfato amónico	103
2.5.1.3. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel AcA 44)	104
2.5.1.4. Cromatografía de cambio iónico (DEAE-celulosa)	105
2.5.1.5. Diálisis	106
2.5.1.6. Cromatografías de adsorción (Biogel HTP) ..	106
2.5.1.7. Concentración	106
2.5.1.8. Cromatografía de penetrabilidad (Sephadex G-200)	107
2.5.2. Conservación	107
2.5.3. Equilibrio de agregación	107
2.5.3.1. Influencia del tiempo	107
2.5.3.2. Influencia de la fuerza iónica	108
2.5.3.3. Influencia de la concentración de proteínas	108
2.5.4. Determinación de pesos moleculares	109
2.6. Aislamiento y purificación de la proteína quinasa dependiente de cGMP de fracción soluble	110
2.6.1. Extracción	110

VII

	<u>Pagina</u>
2.6.2. Ultracentrifugación	110
2.6.3. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)	110
2.6.4. Diálisis	112
2.6.5. Cromatografía de cambio iónico (DEAE-celulosa)	112
2.6.6. Concentración	112
2.6.7. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel AcA 44)	112
2.7. Aislamiento y purificación de las proteína quinasas dependientes de nucleotidos cíclicos de fracción so- luble	113
2.7.1. Extracción	113
2.7.2. Diálisis	113
2.7.3. Cromatografía de cambio iónico (fosfocelulosa)	113
2.7.4. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)	115
2.7.5. Concentración	115
2.7.6. Cromatografías de penetrabilidad (Sephadex G-100)	115
2.8. Proteína quinasas asociadas a fracción particulada..	116
2.8.1. Obtención de los preparados de membranas	116
2.8.2. Aislamiento y purificación	119
2.8.2.1. Solubilización	119
2.8.2.2. Eliminación del detergente	119
2.8.2.3. Cromatografía de cambio iónico (DEAE-celu- losa)	121
2.8.2.4. Concentración	121
2.8.2.5. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel AcA 22)	121

VIII

	<u>Página</u>
2.8.3. Separación de dos actividades de proteína quina- nasa mediante choque osmótico del preparado de membranas	122
2.9. Caracterización enzimática	124
2.10. Proteína ligante de cAMP (PL)	124
2.10.1. Aislamiento y purificación	124
2.10.1.1. Extracción	124
2.10.1.2. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)..	126
2.10.1.3. Concentración	126
2.10.1.4. Cromatografía de penetrabilidad (Sepha - dex G-100 y Sephadex G-200)	127
2.10.2. Interacción de la proteína ligante de cAMP con el sistema de proteína quinasa	127
2.11. Aislamiento y caracterización de un inhibidor ter- moestable del sistema enzimático proteína quinasa..	128
2.11.1. Ensayo de la actividad inhibidora	128
2.11.2. Purificación	128
2.11.2.1. Extracción	128
2.11.2.2. Tratamiento térmico	128
2.11.2.3. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)..	130
2.11.2.4. Concentración	130
2.11.2.5. Cromatografía de penetrabilidad (Sepha - dex G-25)	131
2.11.2.6. Cromatografía de cambio iónico (Dowex 50w x 4)	131
2.11.2.7. Cromatografía de penetrabilidad (Sepha - dex G-10)	132

IX

	<u>Página</u>
2.11.2.8. Electroforesis en capa fina	132
2.11.3. Determinación de la naturaleza y característi	
cas físicas	133
2.11.3.1. Espectroscopía ultravioleta	133
2.11.3.2. Análisis de aminoácidos	134
2.11.3.3. Resonancia magnética nuclear	135
2.11.3.4. Espectroscopía infrarroja	135
2.11.4. Tratamiento proteolítico	135
2.11.5. Peso molecular	135
2.11.6. Otras características cromatograficas del in-	
hibidor. Retención por adsorbentes	136
2.11.6.1. Cromatografía en capa fina (Celulosa) ...	137
2.11.6.2. Cromatografía de cambio iónico (DEAE-ce-	
lulosa y fosfocelulosa)	137
2.11.6.3. Adsorción por alúmina y carbón activo ...	137
2.11.7. Actividad inhibidora asociada a fracción par-	
ticulada	138
2.12. Valoración de proteínas	138
<u>3. RESULTADOS Y DISCUSION</u>	139
3.1. Purificación de (γ - 32 P)ATP	140
3.2. Estudios preliminares	140
3.2.1. Actividades proteína quinásicas y ligantes de	
nucleotidos cíclicos en distintas etapas del	
desarrollo	140
3.2.2. Efecto del tratamiento ácido	151

	<u>Página</u>
3.3. Proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción	
soluble	155
3.3.1. Aislamiento y purificación	155
3.3.2. Conservación	164
3.3.3. Estudios del equilibrio de agregación	166
3.3.3.1. Influencia del tiempo	166
3.3.3.2. Influencia de la fuerza iónica	166
3.3.3.3. Influencia de la concentración de proteí- nas	169
3.3.4. Pesos moleculares	172
3.3.5. Caracterización enzimática	174
3.3.5.1. Efecto de cationes divalentes	175
3.3.5.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la acti- vidad y disociación de la enzima	179
3.3.5.3. Efecto de la histona-sustrato y del tiem- po de incubación en la disociación de la enzima	182
3.3.5.4. Dependencia de la actividad con el tiempo	185
3.3.5.5. Proteínas sustratos. Cálculo de Km para la histona	185
3.3.5.6. Activación por nucleótidos cíclicos. Cál- culo de Ka para cAMP, cGMP y cIMP	189
3.3.5.7. Cálculo de Km para ATP y Kd para cAMP	193
3.4. Proteína quinasas dependientes de cGMP	195
3.4.1. Aislamiento y purificación	195
3.4.2. Caracterización enzimática	201

XI

	<u>Página</u>
3.4.2.1. Efecto de cationes divalentes	201
3.4.2.2. Proteínas sustratos	206
3.4.2.3. Activación por nucleótidos cíclicos. Cálculo de Ka para el cAMP, cGMP y cIMP	208
3.4.2.4. Efecto de proteínas inhibidoras	210
3.4.2.5. Efecto de compuestos con grupos tiólicos..	210
3.4.2.6. Cálculo de Km para el ATP	212
3.5. Proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos	215
3.5.1. Aislamiento y purificación	215
3.5.2. Relación de las proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos con otros componentes del sistema proteína quinasa	221
3.5.3. Caracterización enzimática	223
3.5.3.1. Requerimiento de catión divalente	223
3.5.3.2. Proteínas sustratos	226
3.6. Proteína quinasas asociadas a fracción particulada..	226
3.6.1. Distribución de la actividad quinásica asociada a fracción particulada	227
3.6.2. Aislamiento y purificación de las proteína quinasas asociadas a membranas (PQM)	227
3.6.3. Caracterización enzimática	231
3.6.3.1. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad y disociación de la enzima	231
3.6.3.2. Efecto de distintos cationes divalentes ..	232
3.6.3.3. Proteínas sustratos	235

XII

	<u>Página</u>
3.6.3.4. Fosforilación endógena	235
3.6.4. Separación de dos actividades de proteína qui- nasa dependientes de cAMP asociadas a membra - nas mediante choque osmótico	238
3.6.5. Caracterización enzimática diferencial de PQM-1 y PQM-2	241
3.6.5.1. Cálculo de Km para el ATP	243
3.6.5.2. Cálculo de Km para la histona	243
3.6.5.3. Activación por nucleótidos cíclicos	243
3.6.6. Conservación	248
3.7. Proteína ligante de cAMP (PL)	249
3.7.1. Aislamiento y purificación	249
3.7.2. Conservación	253
3.7.3. Interacción de la proteína ligante de cAMP con el sistema proteína quinasa	254
3.8. Aislamiento y caracterización de un inhibidor ter - moestable del sistema proteína quinasa	258
3.8.1. Purificación	258
3.8.2. Determinación de la naturaleza y característi- cas físicas del inhibidor	267
3.8.3. Tratamiento proteolítico	270
3.8.4. Peso molecular	271
3.8.5. Otras características cromatográficas del inhi bido. Retención por adsorbentes	273
3.8.6. Actividad inhibidora asociada a fracción parti culada	274

XIII

	<u>Página</u>
3.8.7. Mecanismo de inhibición	274
3.8.8. Efecto del inhibidor sobre los distintos compo- nentes del sistema proteína quinasa	277
3.8.9. Efecto del inhibidor sobre otros sistemas enzi- máticos	279
3.8.10 Variación de la actividad inhibidora a lo lar- go del desarrollo	280
<u>4. CONCLUSIONES</u>	283
<u>5. PRODUCTOS</u>	293
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	297

INTRODUCCION

1.1. Generalidades

Las quinasas son enzimas que transfieren el grupo fosforilo en gamma del ATP a algunas moléculas nucleofílicas aceptoras. Otros nucleosidos trifosfato pueden reemplazar, a veces, al ATP como donador de fosforilo.

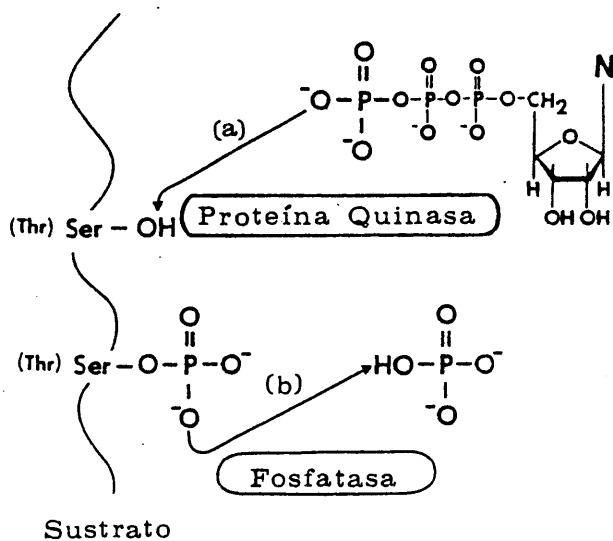
Para que tenga lugar la reacción catalítica se requiere un catión divalente, generalmente Mg^{2+} , y en este sentido las quinasas pueden ser incluidas entre las metaloenzimas que constituyen alrededor de una tercera parte de las enzimas conocidas. El Mg^{2+} tiene una gran afinidad por el ATP^{4-} , formando el quelato $Mg \cdot ATP^{2-}$ que es el verdadero sustrato de la enzima.

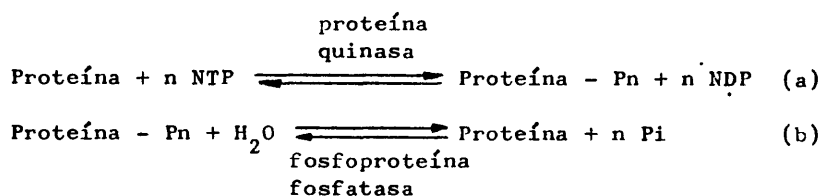
Existe una gran variedad de quinasas que se denominan - atendiendo al sustrato nucleofílico: hexoquinasas, fosfofructoquinasas, galactoquinasas, adenilato quinasas, nucleosido difosfoquinasas, arginina quinasas, creatina quinasas, acetato quinasas, asparto quinasas, succinato tioquinasas, piruvato quinasas/ y proteína quinasas.

Los primeros estudios sobre proteína quinasas (ATP: pro

teína fosfotransferasa, EC 2.7.1.37) datan de 1.954 y fueron realizados por Burnett y Kennedy (1), aunque la existencia de este tipo de enzimas había sido sugerida con anterioridad por Friedkin y Lehninger (2).

Posteriormente, como consecuencia de la intensa experimentación llevada a cabo en el metabolismo del glucógeno, se descubrió que la modificación covalente reversible de proteínas es un importante proceso regulador. El primer ejemplo de este tipo de control fue descrito para la glucógeno fosforilasa, enzima - que se fosforila y activa por acción de una proteína quinasa que se denominó fosforilasa quinasa (3). Desde entonces, se han descrito más de veinte enzimas cuyas actividades se regulan por fosforilación-defosforilación (4), proceso que catalizan proteína - quinasas y fosfoproteína fosfatasa:





Se ha puesto mucha más atención en las proteína quinasas y su control que en las fosfoproteína fosfatasas. De las primeras, existen una serie de excelentes revisiones en lo referente a su aislamiento, propiedades físicas y estudios cinéticos -- (5-11).

Por lo general NTP es ATP, pero existe al menos un tipo de proteína quinasa, descrita por vez primera en cerebro/por Rodnight y Lavin (12), para la cual el GTP es un donador tan efectivo como el ATP.

Los aminoácidos que se fosforilan son generalmente serina y en menor proporción treonina, aunque se han descrito proteína quinasas que transfieren el grupo fosforilo desde el ATP a histidina o lisina (13).

La defosforilación que catalizan las fosfatas (ecuación b) puede ser llevada a cabo también por las proteína quinasas revirtiendo la ecuación a. Este extremo fue descrito por vez primera por Rabinowitz y Lipmann (14) y también por Lerch y col/ (15) estudiando una proteína quinasa de levadura que cataliza la fosforilación de fosvitina y caseína. Rosen y Erlichman (16) han encontrado que la autofosforilación de la proteína quinasa depen

diente de cAMP tipo II de corazón bovino es también reversible./
Por el momento, se desconoce la significación fisiológica de la -
defosforilación llevada a cabo por la propia proteína quinasa.

Las proteínas fosforiladas pueden actuar como efectores
fisiológicos de una gran variedad de agentes reguladores (17). -
En la FIG. 1 se esquematiza el papel postulado para la fosforila
ción de proteínas como mediadora de algunos de los efectos bioló
gicos de diversos agentes reguladores entre los que se incluyen/
 Ca^{2+} , cAMP, cGMP y las hormonas y neurotransmisores que actúan a
través de estos nucleótidos, insulina, hormonas esteroídicas e -
interferón (17).

Otros factores que afectan específicamente a los siste
mas de fosforilación son la hormona tiroidea, que regula la acti
vidad proteína quinasa de hígado de rata (18), el virus Vaccinia
que afecta la fosforilación de proteínas ribosomales en células/
HeLa (19), el hemo implicado en la fosforilación del factor de -
iniciación eIF_2 por parte de una proteína quinasa independiente/
de cAMP (20-22) y la luz que, a través de un mecanismo indirecto,
estimula la fosforilación de la rodopsina por una proteína quina
sa endógena (23), encontrándose recientemente que la actividad -
de la proteína quinasa de los segmentos exteriores de los baston
cillos de la retina puede ser modulada independientemente por nu
cleótidos cíclicos y luz (24). Proteína quinasas aisladas de clo
roplastos también son dependientes de luz (25).

Las reacciones de fosforilación-defosforilación (ecua
ciones a y b) tienen lugar en todos los tipos de células eucarió
ticas examinadas.

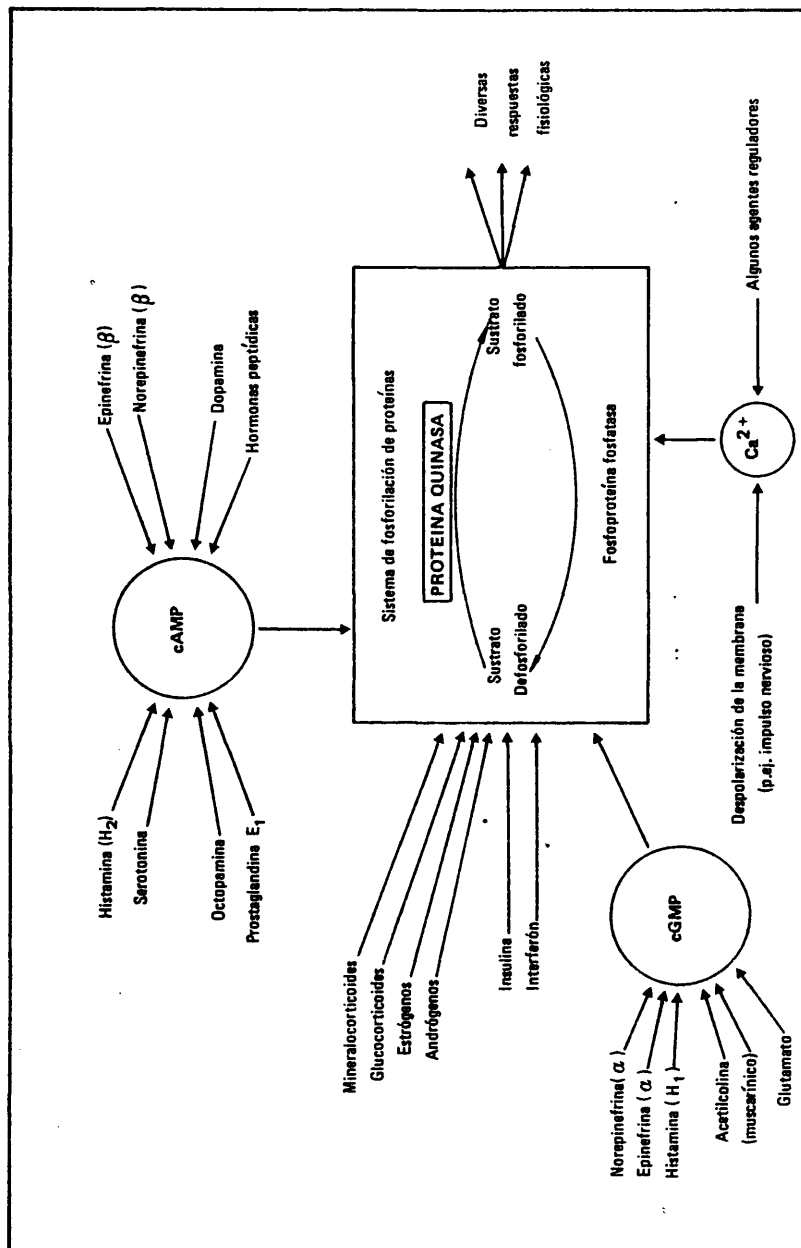


Fig. 1.- Diagrama esquemático del papel postulado para la fosforilación de proteínas como mediador de los efectos biológicos de una variedad de agentes reguladores.

En cuanto a procariontes se refiere, se describió por vez primera la existencia de una proteína quinasa en *E. coli* (26) hecho recientemente confirmado (27). También se ha encontrado actividad de proteína quinasa en estreptococos orales (28) y en *Salmonella typhimurium* (29). Strand y August (30), detectaron por vez primera actividad de proteína quinasa viral en virus de leucemia Rauscher y estomatitis vesicular. Posteriormente se ha encontrado actividad proteína quinásica en muchos virus -RNA y DNA de células animales como por ejemplo en los de sarcoma de ratón (31)/ y hepatitis B (32), así como fosfoproteínas y sustratos para la fosforilación (para revisión ver 8).

1.2. Clasificación de las Proteína Quinasas.

Se puede hacer una clasificación de las proteína quinasas sobre la base de su regulación por agentes específicos (TABLA I).

Tsung y col (33) han purificado y caracterizado parcialmente una proteína quinasa en leucocitos polimorfonucleares humanos que se activa en la misma extensión por cIMP y cAMP, y estudios cinéticos de actividad ligante de nucleótidos cíclicos en sistema nervioso del lepidóptero Galleria mellonella realizados por Tsuzuki y col (34), sugieren la existencia de una proteína quinasa dependiente de cIMP. Sin embargo, aunque la estimulación de la actividad de proteína quinasa por cIMP ha sido observada en otros sistemas, la interpretación más generalmente aceptada de este fenómeno es la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP por el cIMP, puesto que no se han podido separar, utilizando distintos procedimientos, las actividades dependientes de cAMP y cIMP (33).

TABLA 1		
CLASIFICACION DE LAS PROTEINA QUINASAS		
CATEGORIA	DESIGNACION	ENTIDADES RECONOCIDAS
1	Proteína quinasas dependientes de cAMP (PKA).	Tipos I y II.
2	Proteína quinasas dependientes de cGMP (PKG).	Una sola entidad.
3	Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}	Fosforilasa quinasa y quinasa de la cadena ligera de miosina.
4	Proteína quinasas dependientes de fosfolípidos y activadas por Ca^{2+}	Una sola entidad.
5	Proteína quinasas dependientes de RHA de doble banda.	Una sola entidad.
6	Proteína quinasas independientes de mensajero.	Muchos ejemplos conocidos.

1.3. Proteína quinasas dependientes de cAMP (PQA)

1.3.1. Sistema cAMP - Proteína Quinasa

Sutherland y Rall, en 1.960, enunciaron la hipótesis - de la intervención del cAMP como segundo mensajero de la acción/ hormonal (35). Estudios posteriores de Walsh y col (36), utilizando la glucogenolisis de músculo esquelético como sistema modelo, pusieron de manifiesto que el mecanismo de acción del cAMP - transcurre a través de una proteína quinasa dependiente de este/ nucleotido cíclico.

La elevación de los niveles de cAMP en diferentes tejidos por la acción de determinadas hormonas (37), la presencia de proteína quinasas dependientes de cAMP en todos los tejidos de mamíferos examinados (7 y 38) y el hecho de que la proteína quinasa dependiente de cAMP, junto con la fosfodiesterasa, son los/ únicos receptores de alta afinidad para el cAMP en los organismos eucarióticos, son compatibles con la hipótesis de que la mayoría, sino todas, de las acciones del cAMP en sistemas de mamíferos están mediadas por la fosforilación de proteínas (5 y 38), acerca de la cual Walsh ha realizado unas interesantes consideraciones (39).

Puesto que la fosforilación puede afectar la función biológica de las proteínas en muy diversa forma, esta elegante teoría permite explicar la gran diversidad de efectos inducidos/ por diferentes hormonas (FIG. 2).

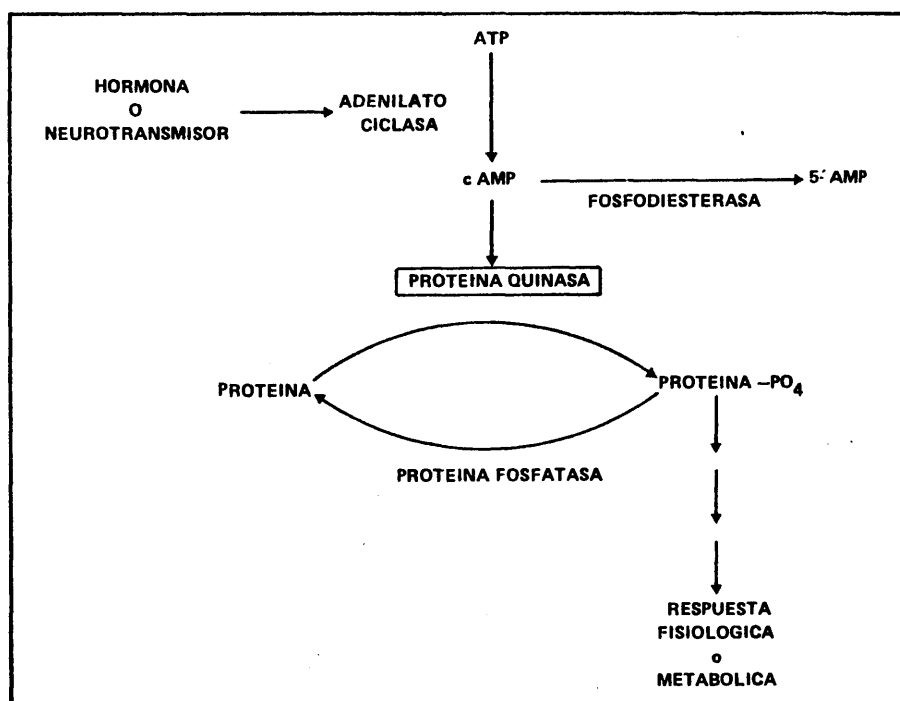


FIG.2.- Papel de la proteína quinasa en el mecanismo de acción del cAMP.

Las acciones fisiológicas mediadas por el cAMP configuran un amplio espectro que abarca fenómenos tan diversos como regulación metabólica, contracción, secreción, síntesis y degradación de macromoléculas, transporte iónico, agregación plaquetaria, dispersión de melanocitos y regulación del crecimiento celular, entre otras.

La lista de proteínas que sirven como sustratos "in vitro" para la proteína quinasa dependiente de cAMP es considerable y su fosforilación "in vivo" podría dar cuenta de gran parte de las acciones fisiológicas mencionadas. Sin embargo, la fosforilación observada "in vitro" de muchas de estas proteínas no ha

podido ser confirmada "in vivo" y por el contrario de muchas proteínas cuya fosforilación "in vivo" se conoce, no se tiene noticia aún acerca de su función fisiológica. En consecuencia, no se puede asegurar que la fosforilación de proteínas específicas pueda dar cuenta de la gran cantidad de procesos fisiológicos mediados por el cAMP.

Otra posible vía de actuación del cAMP sería a través/ de proteínas receptoras del mismo, sin que medie necesariamente/ la fosforilación. Aunque hay precedentes en células procarióticas de al menos un mecanismo de acción del cAMP que implica su interacción directa con regiones específicas del DNA facilitando la transcripción de ciertos genes (40 y 41), no se ha establecido todavía ninguna acción del cAMP en células eucarióticas que no venga mediada por la proteína quinasa dependiente de cAMP.

No obstante, se han descrito varias proteínas receptoras de cAMP no relacionadas directamente con proteína quinasas./ Yuh y Tao (42) y Ueland y Døskeland (43) han encontrado una proteína ligante de cAMP y adenosina en eritrocitos de conejo e hígado de ratón, respectivamente. Tsuzuki y Kiger (44) describen en huevos del díptero Drosophila melanogaster una proteína receptora de cAMP que, aunque menos caracterizada, podría ser idéntica a las dos anteriores.

La función de estas proteínas ligantes de cAMP permanece todavía desconocida, pero su mera existencia pone en entredicho que la proteína quinasa dependiente de cAMP sea el único transductor de la acción de este nucleótido cíclico.

1.3.2. Características moleculares

1.3.2.1. Estructura : subunidades y estequiometría. Mecanismo de activación.

Una aproximación al conocimiento del mecanismo por el cual el cAMP ejerce sus diversos efectos fisiológicos consiste en estudiar su receptor celular, la proteína quinasa dependiente de cAMP. Estas enzimas se componen de dos tipos de subunidades distintas que interaccionan entre sí y con el cAMP de la siguiente forma:



donde RnCn representa la holoenzima inactiva, RncAMPn la subunidad reguladora con el cAMP unido, C la subunidad catalítica libre, activa, y n el número de especies moleculares presentes.

Brostrom y col (45) describieron los datos iniciales acerca de la activación de la proteína quinasa por cAMP a base de un sistema tipo "V" según la definición de Monod, Wyman y Changeux.

Ogez y Segel (46) y Swillens y Dumont (47) han discutido los posibles mecanismos de esta activación. Los primeros sostienen el modelo en el cual la disociación de C de la holoenzima es anterior a la unión del cAMP a R, mientras que para los segundos, la disociación de las subunidades ocurre después de la unión del cAMP a la holoenzima. Recientes trabajos de Chau y col (48),

Tsuzuki y Kiger (49) y Builder y col (50) apoyan este último mecanismo en el que tiene lugar la disociación a través de la formación de un complejo ternario entre R, C y cAMP, enzimáticamente activo.

Una posible explicación de porqué un mecanismo tan especial ha tenido ventaja a nivel evolutivo, podría radicar en la capacidad de permanencia de la respuesta independientemente del estímulo inicial. Otra atractiva posibilidad es que por medio de la disociación se permite una actuación independiente de ambas subunidades y RcAMP podría tener una función similar a la proteína CAP que regula la síntesis de mRNA en la represión por catabolitos en células procarióticas, aunque este extremo no ha sido confirmado experimentalmente. La disociación proporcionaría además un mecanismo para la transmisión de la señal del cAMP entre orgánulos subcelulares ya que el propio cAMP no parece migrar entre ellos. En este sentido, existe evidencia de que la subunidad catalítica puede ser traslocada penetrando en regiones celulares inaccesibles a la holoenzima, lo que podría explicar el porqué ciertas hormonas polipeptídicas regulan funciones tales como la transcripción genética nuclear.

Trabajando con proteína quinasas dependientes de cAMP/ de fracción soluble purificadas a partir de músculo esquelético/ de conejo y músculo cardíaco bovino, se ha determinado la siguiente estequiometría para la ecuación c (16, 51 y 52):



La holoenzima está compuesta de dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. El peso molecular de la holoenzima oscila entre 152.000 y 170.000, el de las subunidades aisladas del dímero receptor de cAMP entre 42.700 y 55.000 y el de la subunidad catalítica aislada entre 38.000 y 42.000.

La holoenzima es muy asimétrica (53) así como la subunidad receptora de cAMP (53 y 54) mientras que la subunidad catalítica es menos asimétrica (53 y 55).

En la FIG. 3 se muestra un modelo propuesto para la estructura y mecanismo de activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (56).

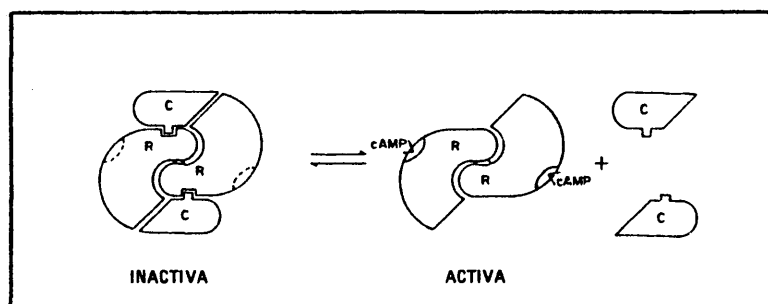
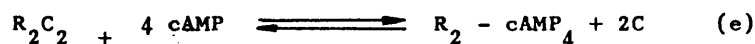


FIG.3.- Modelo de la estructura y mecanismo de activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP.(56).

La enzima contiene un eje de simetría como se predice/ para las proteínas alostéricas. El dominio regulador actúa inhibiendo el dominio catalítico. La unión de cAMP a PQA, que provoca la disociación de los monómeros catalíticos activos, exhibe cooperatividad. Las subunidades reguladoras permanecen como dímeros debido, al menos en parte, a la existencia de puentes disul-

furo.

En presencia de concentraciones saturantes de cAMP, se unen dos moles de nucleotido cíclico por mol de holoenzima (16 y 52). Lincoln y Corbin (57), sin embargo, han descrito que se unen cuatro moles de cAMP a la holoenzima y en base a estos datos han propuesto la siguiente estequiometría de activación (57):



Recientemente Corbin y col (58) han descrito que la subunidad reguladora une dos moles de cAMP por mol de monómero.

Aunque se ha generalizado la naturaleza tetramérica para las proteína quinasas dependientes de cAMP, existen algunas enzimas diméricas de este tipo como las del díptero *Drosophila melanogaster*, de peso molecular 70.000 (49) y la de la levadura/*Saccharomyces cerevisiae* de peso molecular 58.000 (59) cuya activación presumiblemente se lleva a cabo según la ecuación:



La primera y única preparación homogénea de proteína quinasas dependiente de cAMP de membrana, obtenida por Uno y col/ (60) a partir de cerebro bovino, también presenta estructura dimérica aunque estos resultados no tienen porqué hacerse extensibles a todas las proteína quinasas asociadas a membrana ya que es posible que la experimentación con la enzima solubilizada, fuera de su entorno lipídico, los condicione de alguna forma. No --

obstante una proteína quinasa solubilizada de fracción particula da de corazón de conejo tiene un coeficiente de sedimentación lo suficientemente alto para asignarle una estructura tetramérica - (61).

Otra posible excepción al esquema de activación de la/ ecuación d, la constituye la proteína quinasa dependiente de -- cAMP de espermatozoides de erizo de mar. La holoenzima tiene un/ peso molecular de 230.000 estimado por cromatografía de penetra- bilidad. El peso molecular de la(s) subunidad(es) reguladora(s)/ es de 165.000 y el de la(s) subunidad(es) catalítica(s) 73.000,/ lo que sugiere que esta última subunidad puede existir como un - dímero (62).

1.3.2.2. Isoenzimas: Propiedades y distribución

Se pueden distinguir dos tipos de isoenzimas dependien tes de cAMP por su comportamiento cromatográfico en DEAE-celulo- sa (63-68). Las de tipo I (PKI) eluyen en DEAE-celulosa con -- 60 mM de NaCl, aproximadamente, son fácilmente disociadas por - NaCl 0.5 M o histona y reasocian lentamente después de retirar - el cAMP (68). Las de tipo II (PK II) eluyen del DEAE-celulosa - con aproximadamente 160 mM de NaCl, son disociadas lentamente - por NaCl 0.5 M o histona y reasocian rápidamente después de reti rar el cAMP (68). La presencia de Mg-ATP impide la disociación - de la holoenzima de tipo I por NaCl o histona (68).

Otra importante diferencia entre los tipos I y II es - su respuesta al cAMP. La isoenzima PK II es menos dependiente - del cAMP que la PK I en condiciones de ensayo estandar (66, 68--

70).

Ueland y Døskeland (71) han comparado la activación de ambas isoenzimas por el cAMP en presencia de MgATP en función de la dilución y concentración de sales e histona en el medio de incubación.

La dependencia de cAMP de la isoenzima PK I y en menor extensión de la PK II, disminuye cuando se mide a concentraciones progresivamente más bajas y es preciso diluir 200 veces más la isoenzima PK I que la PK II para que ambas muestren el mismo grado de activación (71).

Incrementando la concentración de histona en el ensayo se induce la activación de ambas isoenzimas. Es de destacar que mientras la PK I se disocia más fácilmente que la PK II por histona en ausencia de Mg.ATP (68), en su presencia ocurre lo contrario, siendo la enzima PK II activada en mucha mayor extensión que la PK I. El efecto producido por la histona declina a medida que se aumenta la concentración de enzima. En presencia de Mg.ATP no se observa activación de ninguna de las dos isoenzimas por la concentración salina (71).

La relación de actividad (-cAMP/+ cAMP) para ambas isoenzimas aumenta progresivamente con el tiempo de incubación resultando el efecto más pronunciado a altas concentraciones de histona (71).

La proporción de las formas I y II varía para un determinado tejido según la especie de mamífero de que se trate; para

una misma especie, dependiendo del tipo de tejido y para un determinado tejido de mamífero entre los diferentes tipos de células del mismo, como sucede con las fibras de músculo esquelético (9). Ambos tipos de isoenzimas se han encontrado en cultivos clonados de células de ovario de hamster (72) sugiriendo su existencia simultánea en un mismo tipo de células.

La razón de ser de ambas isoenzimas no ha sido elucidada con claridad. Aunque sus subunidades catalíticas son muy similares y no se ha descrito diferencia alguna en cuanto a la especificidad de sustrato, los estudios realizados sugieren que uno/ y otro tipo tienen diferentes funciones intracelulares y una regulación independiente. Así, en músculo cardíaco una significativa proporción de la enzima tipo II está asociada a membrana (61)/ y la relación de actividad entre ambas enzimas varía con la hipertrofia cardíaca (73) y el desarrollo de ciertos tumores (74)/ y durante el crecimiento y diferenciación de ciertos tejidos (75), la embriogénesis y desarrollo postnatal (76) y el ciclo celular - (72 y 77).

Históricamente los tipos I y II se han referido a músculo esquelético de conejo y corazón bovino, respectivamente, por ser predominantes en estos tejidos y donde mejor se han estudiado.

La holoenzima de músculo esquelético de conejo (tipo I) ha sido obtenida en forma pura por Beavo y col (67) y Hoppe y Wagner (78). Taylor y col han obtenido la holoenzima de tipo I a partir de músculo esquelético porcino (79 y 80).

La proteína quinasa dependiente de cAMP de tipo II ha sido obtenida en forma pura por vez primera por Rubin y col (81) y posteriormente por Hofmann y col (52).

La subunidad reguladora se obtiene no solo por disociación de la holoenzima pura sino, como es más frecuente, utilizando métodos de purificación directos como las técnicas de cromatografía de afinidad en las que derivados de cAMP se unen covalentemente a la matriz.

Los métodos de purificación de la subunidad catalítica se basan generalmente en la diferencia de puntos isoeléctricos - ya que esta subunidad es considerablemente más básica que la reguladora o la propia holoenzima. La obtención de la holoenzima y sus subunidades en forma pura y cantidad suficiente, ha permitido la caracterización exhaustiva de ambas isoenzimas. Recientemente, Taylor y col (82,83), comparan estructuralmente ambos tipos con el interés adicional de utilizar para su obtención el mismo tejido, músculo esquelético porcino, en donde ambas formas se encuentran en proporción similar.

En la TABLA II se resumen las propiedades físicas inmunológicas y cinéticas más importantes de las isoenzimas de músculo esquelético de conejo (tipo I) y músculo cardíaco bovino (tipo II).

La única diferencia estructural precisa entre ambas isoenzimas reside en la subunidad ligante de cAMP; resultando ser de mayor tamaño la de tipo II (51,52 y 84). Además, anticuerpos frente a un tipo de subunidad reguladora no se cruzan con la

TABLA II

Propiedades físicas, Inmunológicas y cinéticas de las isoenzimas tipo I (músculo esquelético de conejo) y tipo II (corazón bovino) de la proteína quinasa dependiente de c AMP

<u>Estructura</u>	<u>Tipo I</u>	<u>Tipo II</u>
<u>Parámetros físicos</u>	<u>R_2C_2</u>	<u>R_2C_2</u>
$S_{20,W}$		
R_2C_2	7.0	8.8
$(R\ cAMP)_2$	5.0	4.6
C	3.12	3.6
<u>Pesos moleculares</u>		
R_2C_2	170000	174000
R	48000	55000
C	41000	38000
<u>Puntos isoeléctricos</u>		
R_2C_2	5.1	4.9
$(R\ cAMP)_2$	4.6	3.8
C	7.5 y 8.6	7.6
<u>R actividad inmunológica con antisuero frente</u>		
Holoenzima PKI	+	-
Holoenzima PKII	-	+
Subunidad catalítica	+	-
<u>Respuesta al ATP-Mg</u>		
Sitio de alta afinidad en la holoenzima	+	-
Autofosforilación de R	-	+
<u>Parámetros cinéticos para el ATP-Mg:</u>		
mol ATP unido / mol R_2C_2	2.0	0.0
K_D ap. para ATP (nM)	35	—
Coficiente de Hill ap.	1	—
mol Pi incorporado en R/mol R_2C_2	0	2.0

subunidad reguladora del otro tipo (35 y 36). Contrariamente a lo mantenido en principio por algunos autores, se ha demostrado/ mediante mapas de péptidos trípticos que la subunidad reguladora de tipo I (RI) no puede interpretarse como un fragmento proteolítico de la subunidad reguladora de tipo II (RII) (82).

Las subunidades catalíticas de ambos tipos de holoenzimas tienen idéntica especificidad de sustrato y características/ físicas muy similares aunque no se puede afirmar que sean idénticas a juzgar por sus correspondientes mapas trípticos (82). Se han aislado distintas formas de la subunidad catalítica con puntos isoeléctricos que oscilan entre 6.7 y 8.6 (55,60,87-89).

En resumen, se puede afirmar que existen solamente dos/ tipos de subunidades reguladoras (RI y RII) y un tipo de subunidad catalítica, aunque se haya detectado cierto grado de heterogeneidad en cuanto a sus puntos isoeléctricos. Estudios de hibridación entre las dos isoenzimas de una gran variedad de tejidos/ y organismos han resultado positivos y subunidades catalíticas procedentes de la holoenzima tipo I recombinan con RII y viceversa.

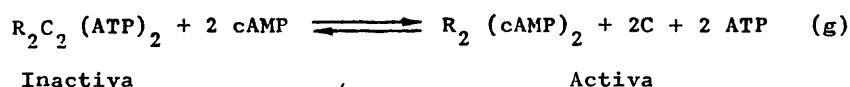
La unión de cAMP a la forma I presenta cooperatividad - positiva tanto con la holoenzima como con el dímero receptor aislado (52,90). También se da cooperatividad en la unión de este último a la subunidad catalítica. Por el contrario los dímeros de la subunidad reguladora de la forma II no exhiben cooperatividad en la unión del cAMP (91).

La holoenzima tipo I une MgATP con una elevada afinidad

(Kd ap 35 nM) (51 y 52) sin que esta unión vaya asociada a actividades fosfotransferasa o ATPasa (51,92 y 93). No se ha observado un fenómeno similar con la forma II. El sitio de alta afinidad está asociado con la holoenzima y no permanece en las subunidades reguladora o catalítica disociadas (51).

El MgATP incrementa la Kd ap de la unión del cAMP a la holoenzima tipo I en un factor de 10-40 (52), dependiendo de las condiciones del ensayo, concentración de enzima y otras variables y suprime la cooperatividad positiva (52) (TABLA II). Su efecto es en definitiva la estabilización de la estructura de la holoenzima evitando su disociación por histona o NaCl (68).

La interacción entre ATP, cAMP y la holoenzima de tipo I se puede resumir en la ecuación: (51)



El ATP actúa como un antagonista del cAMP favoreciendo la recombinación de las subunidades, y en su ausencia, la reasociación tiene lugar muy lentamente. En músculo esquelético, la concentración de ATP es de orden milimolar, con lo que en condiciones fisiológicas se encuentra unido a la enzima, lo que trae como consecuencia un aumento en la Kd para el cAMP que la hace coincidir con las concentraciones fisiológicas de este efector. Es de destacar que cualquier agente capaz de alterar la unión del ATP a la holoenzima puede tener un importante papel regulador.

La posibilidad de un solapamiento entre los sitios de unión del cAMP y del ATP a la holoenzima ha quedado descartada - (94).

Recientemente, Hoppe y col (95) mediante utilización - de análogos, han demostrado que el sitio de unión del ATP en la - holoenzima y en la subunidad catalítica son casi idénticos con - respecto al dominio correspondiente a la porción de adenina, su - poniendo que este nucleótido interacciona con el mismo sitio re - ceptor en ambos casos. Esta hipótesis ha sido comprobada median - te técnicas de marcaje de fotoafinidad (96).

Localizando el sitio de unión del ATP a la subunidad - catalítica en el dominio de interacción de ambas subunidades, co - mo ocurre con la isoenzima PK II, se puede establecer un modelo/ (FIG. 4), en el que el sitio de alta afinidad para este nucleoti - do en la holoenzima se conseguiría sobre la base de una contribu - ción de la subunidad reguladora (95 y 96).

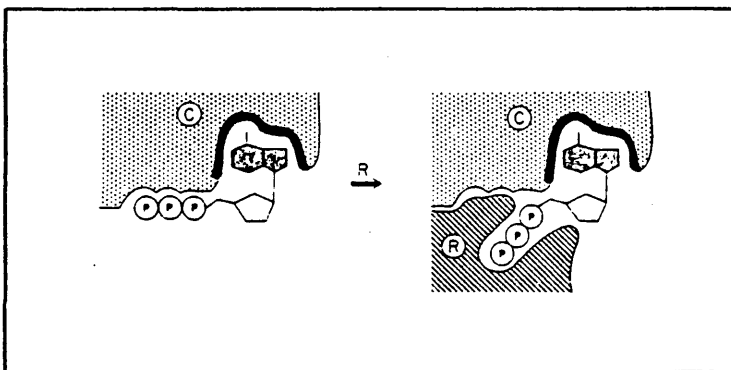


FIG.4.- Modelo de la relación existente entre el sitio para el ATP en la subunidad catalítica libre (C) y en la holoenzima. Se ha acentuado el subsitio de acomodación de la parte de adenine de la molécula de ATP que es similar para la holoenzima y C. La subunidad reguladora está directamente implicada en el sitio de alta afinidad para el ATP(95).

La disminución de la velocidad de disociación de la holoenzima se produciría por la unión a la subunidad R del resto - de la molécula de ATP que se encuentra unido por la adenina a la subunidad catalítica.

Se ha demostrado que la cooperatividad positiva para - el cAMP, encontrada por Hofmann y col (52), puede hacerse desaparecer e incluso transformarse en negativa cuando se promueve la asociación de la enzima con ATP y se puede conseguir un efecto - opuesto favoreciendo la disociación con NaCl (90), de tal forma/ que el efecto del ATP sobre la unión del cAMP puede ser descrito simplemente por una disminución en la disociación espontánea de/ la holoenzima.

En apoyo de los modelos propuestos, diferentes estudios cinéticos indican que no existe en la subunidad catalítica otro/ sitio de unión para el ATP distinto del centro activo (97 y 98)/ y se ha demostrado que el ATP no se une a la subunidad reguladora aislada ni afecta a la unión del cAMP (99).

El efecto del Mg.ATP sobre la forma II es bien distinto del ejercido sobre la forma I. En presencia de Mg.ATP la subunidad reguladora de la proteína quinasa de corazón bovino es fosforilada por la subunidad catalítica (100) incorporándose un mol - de fosfato por mol de subunidad reguladora. Se ha identificado - el enlace proteína-fosfato como fosforil serina (100). Este fenómeno se ha comprobado posteriormente con holoenzima de tipo II - de fracción soluble de otros tejidos como músculo esquelético - (86) y cerebro bovino (60). También se ha observado autofosforilación con la proteína quinasa de membrana de cerebro bovino (60) El sitio de autofosforilación en la subunidad reguladora inter--

acciona con la subunidad catalítica como un análogo del sustrato proteico. No se ha detectado fosforilación de la subunidad reguladora de la enzima de músculo de conejo (52 y 86) aún cuando ambas holoenzimas (tipo I y II) se incuban juntas (52).

El fosfato incorporado en la subunidad reguladora es susceptible de hidrólisis por fosfoproteína fosfatasas (100) o por reversión de la reacción (16, 101) aunque este último mecanismo no parece tener importancia "in vivo" porque las concentraciones de ADP requeridas no son fisiológicas.

La fosforilación de la subunidad reguladora no requiere la disociación de la holoenzima sino que ocurre por un mecanismo/intramolecular (84,101 y 102).

El efecto de la autofosforilación se deja sentir sobre/la unión del cAMP a la holoenzima y sobre la velocidad de reasociación de las subunidades.

La autofosforilación disminuye la K_d ap para el cAMP de $2.5 \mu M$ a $0.5 \mu M$ (52) suprimiendo la cooperatividad negativa de la unión (52) lo que se traduce en un aumento de la sensibilidad de/la holoenzima hacia el cAMP que disminuye la concentración necesaria para la activación de la enzima (52). Para otros autores, sin embargo, las formas fosfo y defosfo de la enzima se disocian en la misma extensión a una concentración dada de cAMP (103). Lo que parece totalmente comprobado es la influencia de la autofosforilación sobre la velocidad de reasociación de las subunidades (101, 103, y 104). La forma defosfo reasocia con la subunidad catalítica cinco veces más rápido que la forma fosfo.

En la TABLA III se resumen los efectos del MgATP sobre ambas isoenzimas. El MgATP disminuye la afinidad de la forma I - por el cAMP diez veces e incrementa la afinidad de la forma II - seis veces. Como a concentraciones fisiológicas el MgATP satura/ambas enzimas, "in vivo" sus afinidades por el cAMP son muy similares.

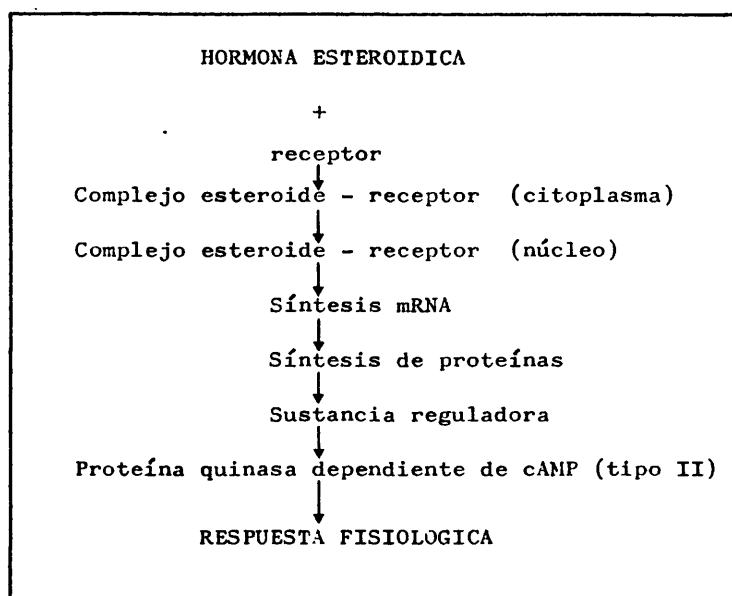
TABLA III

<u>Parámetros cinéticos de las proteína quinasas dependientes de cAMP tipos I y II en presencia y en ausencia de Mg·ATP.</u>				
	<u>Tipo I</u>		<u>Tipo II</u>	
	<u>-Mg·ATP</u>	<u>+Mg·ATP</u>	<u>-Mg·ATP</u>	<u>+Mg·ATP</u>
Moles de cAMP unidos por mol de holoenzima (R_2C_2).	2.0	2.0	2.0	2.0
Kd ap. para cAMP (μM).	0.1	1.0	2.8	0.5
Coeficiente de Hill ap.	1.2	1.0	0.85	1.0
Reasociación de $(RcAMP)_2$ y C.	lenta	rápida	rápida	lenta
Ref. 52 y 103.				

Se ha visto que mineralocorticoides, glucocorticoides, - andrógenos y estrógenos afectan a la fosforilación de proteínas - en sus tejidos blancos (105) y a la autofosforilación de la forma II de la proteína quinasa dependiente de cAMP (105). Son necesarios estudios posteriores para determinar si el efecto de las hormonas esteroídicas sobre la fosforilación es consecuencia directa de su incidencia sobre la autofosforilación de la enzima, cuyo mecanismo tampoco se conoce aunque se sabe que es un efecto indirecto.

to que requiere síntesis de novo de proteínas.

Un posible esquema del mecanismo de actuación de las -
hormonas esteroídicas sobre la fosforilación en sus tejidos blancos
es el siguiente (17):



Hay que señalar que la holoenzima de músculo esquelético de conejo (PK I) contiene cantidades significativas de fosfato unido covalentemente a las subunidades reguladora y catalítica. La subunidad catalítica contiene entre 1.7 (89) y 2.2 (87) moles/ de fosfato endógeno estable a ácido por mol de proteína, habiendo fracasado los intentos de incorporar ^{32}P en la proteína incubando con ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP y Mg^{2+} la subunidad catalítica (87,89). También -

ha fracasado la separación del fosfato por diversas fosfatasas - (87), lo que puede indicar que no se utiliza el sistema enzimático adecuado, o que el fosfato se incorpora en el polipéptido en formación y la conformación nativa evita el acceso al fosfato - unido.

Recientemente, sin embargo, Chiu y col han descrito la autofosforilación de la subunidad catalítica de la enzima tipo I de músculo esquelético de conejo (106).

En el seno de esta descripción de las isoenzimas tipos I y II es preciso señalar la existencia de un gran número de estudios sobre proteína quinasas dependientes de cAMP en fracción soluble que presentan características distintas a las señaladas. Sin entrar en detalles, parece sin embargo, que muchas de estas formas se podrían explicar sobre la base de una serie de factores y procesos entre los que se incluyen la degradación y fosforilación variables de las subunidades reguladoras así como la - agregación y disociación de la holoenzima. Un factor adicional - de confusión es la asimetría de la holoenzima y sus subunidades/ lo que ocasiona un comportamiento anómalo en cromatografía de pe netrabilidad y sedimentación.

La clasificación en los tipos I y II se ha realizado - sobre la base de los datos obtenidos con diversas proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble. La proteína quinasa obtenida de fracción particulada de cerebro bovino por Uno y/ col (60) no pertenece a ninguno de los dos tipos; su subunidad - reguladora no inhibe la actividad de la subunidad catalítica de/ la proteína quinasa tipo II. Previamente, estos mismos autores -

(107) han descrito que hígado, músculo esquelético, corazón y cerebro bovinos contienen una proteína quinasa dependiente de cAMP que comprende aproximadamente el 5% de la actividad total del tejido y que puede ser solubilizada con Tritón X-100. Las actividades de músculo, corazón y cerebro eluyen en DEAE-celulosa a una/concentración salina intermedia a la que eluyen PK I y PK II en/las mismas condiciones.

La de hígado, sin embargo, se desdobra en dos componentes uno aparentemente idéntico a PK I y el otro en la misma posición que las enzimas de membrana de los otros tejidos.

Estos resultados sugieren que la proteína quinasa de--pendiente de cAMP asociada a membrana puede ser distinta a las -formas I y II de fracción soluble.

Utilizando membranas de eritrocitos humanos como sistema modelo, (^{32}P) 8 - N_3 cAMP como fotosonda para la subunidad reguladora y el incremento de la fosforilación de proteínas específicas de membrana por (γ ^{32}P) - ATP como medida de la presencia/de una subunidad catalítica activa, Owens y Haley (108) han estudiado el mecanismo de actuación del cAMP y MgATP sobre una pro--teína quinasa asociada a membrana cuya actividad se regula por -ambos nucleótidos. La subunidad reguladora está unida a la mem--brana por una potente interacción presumiblemente hidrofóbica y/sólo puede ser removida por acción de detergentes, como se ha -descrito para otros sistemas. La subunidad catalítica se libera/al ponerse en funcionamiento el mecanismo de activación (FIG. 5A) Con diferente experimentación, Corbin y col (61) han descrito un modelo similar.

Pero el hallazgo más importante hecho por estos autores es que la subunidad reguladora contiene un sitio alostérico/ para el ATP distinto del sitio de unión para el cAMP.

En la FIG. 5B se describe un modelo de regulación de esta enzima por ambos nucleotidos. La unión de MgATP y cAMP a sus respectivos sitios, tiene efectos opuestos sobre el control de la subunidad catalítica.

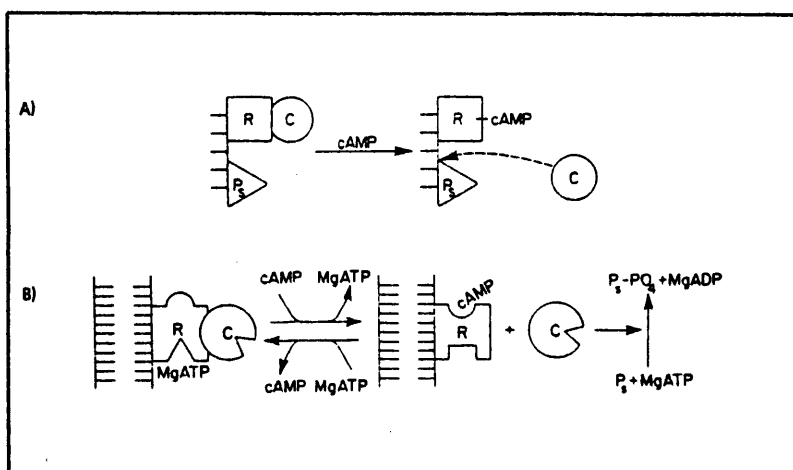


FIG.5.- Proteína quinasa dependiente de cAMP tipo 1M. A) Representación esquemática de la incidencia del cAMP sobre la relación existente entre las subunidades reguladora (R) y catalítica (C), las proteínas sustratos (P_i) y la membrana. B) Mecanismo propuesto para la unión de cAMP, Mg-ATP y subunidad catalítica a la subunidad reguladora. El sitio para el Mg-ATP en la subunidad reguladora es distinto del sitio para el Mg-ATP en la subunidad catalítica (108).

La adición de MgATP disocia rápidamente el cAMP de la subunidad reguladora con o sin la presencia de la subunidad catalítica, aunque en el primer caso la concentración de MgATP requerida es menor, lo que indica una relación cooperativa entre MgATP y C con respecto a las propiedades receptoras de cAMP de la subuni

dad R.

Estos resultados indican que la proteína quinasa tipo I asociada a membrana (IM) difiere significativamente de la enzima soluble estudiada en otros tejidos (IS) no sólo por su diferente compartimentalización sino por su distinta regulación por MgATP/ (108).

1.3.3. Propiedades químicas

El análisis de aminoácidos de RI y RII de corazón bovino (58) muestra que la tipo II contiene más restos ácidos, lo que da cuenta de la unión más fuerte al DEAE-celulosa de la holoenzima tipo II.

La composición de aminoácidos de la subunidad catalítica de músculo esquelético de conejo (87), músculo esquelético porcino (80), corazón bovino (89) e hígado bovino (55) es similar, con cisteína como aminoácido en menor proporción, seguido por metionina e histidina. La mayor diferencia entre ellas es que la de hígado bovino contiene un sólo resto de cisteína por molécula mientras que las demás contienen tres.

Reactivos específicos de grupos tiólicos (DTNB, ácido/p-hidroximercuribenzoico, N-etilmaleimida), inhiben la actividad catalítica (55,87 y 89). La inhibición de la actividad fosfotransferasa por iodoacetamida y N-etilmaleimida se reduce parcialmente por MgATP.

Armstrong y Kaiser (109) han descrito que la holoenzima de corazón bovino contiene 16 grupos SH, 12 de los cuales reaccio

nan con DTNB en la enzima nativa. La modificación de los grupos/tiólicos tiene un escaso efecto sobre la unión de cAMP a la subunidad reguladora, mientras que la reacción de la subunidad catalítica con DTNB conduce a la pérdida de la actividad enzimática. La velocidad de inactivación de la holoenzima con DTNB es considerablemente más rápida que la de la subunidad catalítica libre.

Witt y Roskoski (110) han descrito que el anhídrido etoxifórmico inactiva la subunidad catalítica pero tiene poco efecto sobre la holoenzima tipo II de cerebro bovino. La presencia de la subunidad reguladora o de MgATP tiene un efecto protector frente a la inactivación de la subunidad catalítica. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la holoenzima tipo II se inactiva enzimáticamente porque la subunidad reguladora bloquea/el sitio activo de la subunidad catalítica.

Una modificación química de la subunidad reguladora tipo II de corazón bovino con butanodiona, reactivo de grupos arginilo, bloquea la capacidad de autofosforilación de la subunidad reguladora e inhibe la subunidad catalítica, aunque no afecta a la unión del cAMP (58).

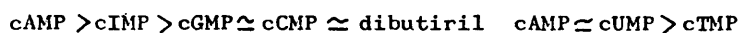
1.3.4. Reacción catalítica

1.3.4.1. Cinética

La reacción catalítica requiere un catión divalente, -- Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} variando su efecto según la fuente de la enzima y las condiciones experimentales (6 y 63). El catión preferido es, por lo general, el Mg^{2+} y el ATP el donador de fosforilo más efec

tivo.

Los nucleótidos cíclicos y sus derivados más comunmente usados pueden ordenarse en cuanto a su capacidad de activación de la enzima de la siguiente forma (63 y 111):



Diversos autores han abordado el estudio de los mecanismos cinéticos de las proteína quinasas dependientes de cAMP. Los resultados obtenidos por Moll y Kaiser (112) y Kochetkov y col (113) mediante análisis cinéticos, sugieren que la reacción transcurre por un mecanismo ping-pong bibi con formación de un intermedio covalente y concuerdan con el hecho de que se marque radiactivamente un resto de histidina de la subunidad catalítica cuando se incubaba con exceso de (γ - ^{32}P) ATP y que el grupo fosforilo se transfiera en una segunda reacción al sustrato proteico (114). La histidina actuaría como un catalizador nucleofílico en el centro activo de la subunidad catalítica.

Sin embargo, se ha descrito la posibilidad de que se den otros mecanismos. Así, utilizando la subunidad catalítica de proteína quinasa de glándula de timo de ternera (98) y de músculo de conejo (97) con histona como sustrato, los resultados obtenidos indican un mecanismo secuencial. Los experimentos de inhibición por producto con MgADP (97) se pueden explicar por un mecanismo ordenado en el que el ATP interacciona primero con la enzima, o por un mecanismo random bibi en el cual se forma un complejo abortivo, MgADP -histona. Los análisis de inhibición con fosfohistona (97) o poliarginina (115) están más de acuerdo con/

un mecanismo random bibi. Son necesarios posteriores estudios para establecer con claridad la cinética de la reacción catalizada por las proteína quinasas dependientes de cAMP.

Una serie de datos en la bibliografía indican un doble desplazamiento del mecanismo de fosforilación, con transferencia del fosfato en gamma del ATP al medio o a las proteínas sustratos.

El descubrimiento de actividades de ATPasa (ATP fosfohidrolasa, EC 3.6.1.3.) dependiente de cAMP asociada a las de -- proteína quinasa (ATP: proteína fosfotransferasa, EC 2.7.1.37) -- dependiente de cAMP de cerebro bovino (112) y unos resultados -- similares con la subunidad catalítica de la enzima de hígado bovino (55) y corazón bovino (116), sugieren que la catálisis del grupo fosforilo al medio puede ser un fenómeno general de importancia en el estudio del mecanismo de fosforilación por proteína quinasas dependientes de cAMP. No se puede, sin embargo, generalizar estas observaciones a la totalidad de este tipo de enzimas ya que existen datos que ponen de manifiesto la imposibilidad de detectar actividad de ATPasa en preparaciones de holoenzima de -- corazón bovino (102) y subunidad catalítica de la enzima de timo de ternera (98).

Con objeto de conocer la estructura del sitio de unión/ del ATP a la subunidad catalítica de la proteína quinasa se ha es tudiado su interacción con numerosos análogos del sustrato (117--121). En estos experimentos el núcleo de adenina ha resultado -- esencial para la inhibición de la actividad catalítica competitivamente con el ATP y aunque discrepando en su orden relativo, los

mejores inhibidores resultan ser: ADP, AMP, adenosina y adenina. Esta especificidad por el núcleo de adenina da cuenta de la paradójica inhibición que ejerce el cAMP a altas concentraciones - ($>10 \mu\text{M}$). En estos estudios, Kuo y col han encontrado inhibición por parte del FMN (117) pero Yamashita y col no (118).

La afinidad por la base heterocíclica decrece según la siguiente secuencia:

Adenina > citósina > uracilo > guanina > hipoxantina

El aumento de grupos fosfato en 5' , así como modificaciones en la ribosa, no afectan mucho a la afinidad del análogo/ por el sitio activo mientras que un anillo ciclofosfato en posición 2',3' o 3',5' en la ribosa la disminuye considerablemente - (121). El 6-amino del anillo heterocíclico es el grupo más sensible, su sustitución o modificación conduce a una gran pérdida de afinidad (121).

A la vista de estos datos se puede afirmar que la base heterocíclica y su grupo amino constituyen dos puntos fundamentales de anclaje del sustrato al centro activo. Recientemente se - ha descrito en proteína quinasa de corazón bovino la existencia/ de una especificidad hacia el Δ -estereoisómero del complejo - MgATP (122).

Con los resultados expuestos anteriormente se ha elaborado el modelo del sitio de unión del ATP a la subunídad catalítica que se muestra en la FIG 6 (121).

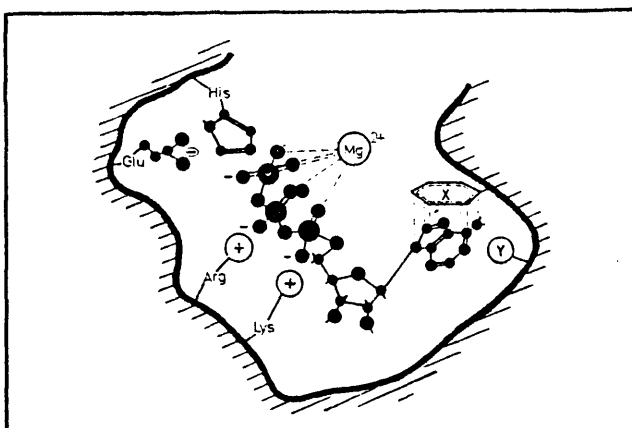


FIG.6.- Modelo de la estructura del sitio activo en la subunidad catalítica (121).

El complejo Mg-ATP se fija al sitio activo de la enzima por una interacción de apilamiento con el resto aromático X y una posible interacción adicional entre el grupo 6-amino de la adenina y el resto Y. La unión del sustrato requiere la libertad conformacional del residuo de ribosa. Se produce asimismo una interacción entre la cadena de polifosfato del ATP con un locus/catiónico a base de restos de lisina y arginina. Este tipo de interacción electrostática es responsable de la fijación de la cadena de polifosfato en la forma adecuada para que tenga lugar el ataque nucleofílico efectuado por un par de electrones del anillo imidazólico de la histidina que actúa como un catalizador nucleofílico. El resultado es la ruptura de la cadena de polifosfato con la disociación del ADP y la unión covalente del fosfato a la enzima para posteriormente ser transferido al sustrato proteico.

1.3.4.2. Especificidad de Sustrato

Muchas son las proteínas fosforiladas por la proteína

quinasa dependiente de cAMP y su número crece constantemente conforme se examinan distintos sistemas.

Entre las enzimas se cuentan la fosforilasa quinasa - (subunidades α y β), glucógeno sintetasa, triglicérido lipasa, piruvato quinasa (tipo L), glicerofosfato aciltransferasa, RNA polimerasa, hidroximetilglutaril CoA reductasa, acetil CoA carboxilasa, colesterol esterasa, fructosa -1.6- difosfatasa, fenil alanina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, anhidrasa carbónica y ATP-citrato liasa.

También son fosforiladas muchas otras proteínas funcionales o estructurales aunque no se conozca aún el significado fisiológico de la fosforilación de muchas de ellas. Entre éstas se incluyen las histonas (H1 y H2B principalmente), proteínas nucleares no histonas, protamina, proteínas asociadas a membrana, proteínas ribosomales, proteínas virales y bacterianas, troponina, -mielina, caseína, fosvitina, filamina y el inhibidor de proteína/fosfatasa.

Un punto clásico de discusión al abordar la especificidad de sustrato es si la enzima reconoce exclusivamente una estructura primaria determinada o si además es necesaria una cierta configuración espacial.

A pesar de la existencia de datos sobre la posibilidad de fosforilación de péptidos procedentes de proteínas sustratos - por fosvitina quinasa (14) y fosforilasa quinasa (123), se admite por algunos autores que los sustratos para la proteína quinasa dependiente de cAMP deben contener alguna conformación tridimensional específica, hipótesis que estaría de acuerdo con que las se--

cuencias de aminoácidos de los sitios de fosforilación de varios sustratos son distintas (7 y 124). Sin embargo, esta idea no se ha visto confirmada al encontrar que la proteína quinasa dependiente de cAMP puede fosforilar también péptidos pequeños (125). Además la desnaturalización de proteínas aumenta su susceptibilidad a la fosforilación (126).

Parece claro que la estructura primaria juega un papel primordial como determinante de la especificidad. No obstante, aunque algunos péptidos sintéticos pueden resultar mejores sustratos que las proteínas intactas (127) es probable que la enzima reconozca además alguna configuración determinada. Small y col (128) en base a las secuencias de los sitios fosforilados de un número de proteínas han determinado que éstas requieren estar en configuración β .

El sitio fosforilable es generalmente serina aunque también se fosforilan restos de treonina como por ejemplo en la mielina y en el inhibidor de proteína fosfatasa. Recientemente se ha descrito la fosforilación catalizada por PQA de hidroxiprolina en un péptido sintético (129). No se ha descrito la fosforilación de restos de tirosina.

Numerosos autores han señalado que las proteínas sustratos de PQA contienen restos de aminoácido básicos en la parte amino terminal del sitio fosforilable. El aminoácido más frecuente es la arginina seguido de lisina y ocasionalmente histidina. A esta conclusión se ha llegado mediante estudios con variantes genéticas de la β caseína (130), histonas ricas en lisina (131) y péptidos sintéticos (132).

Estudios con sustratos naturales de la enzima (104,133 y 134) y con péptidos sintéticos (98,135) han permitido precisar algo más los determinantes de especificidad en la secuencia de los sitios fosforilados.

Dos secuencias muy extendidas en sustratos naturales son:

Lys - Arg - X - X - Ser (P) - X
Arg - Arg - X - Ser (P)

denominadas posición C y D respectivamente, en terminología de Shenolikar y Cohen (136) atendiendo a la posición del aminoácido básico respecto al resto fosforilado que tiene normalmente ocupados ambos lados por aminoácidos hidrofóbicos. Sitios de fosforilación en posición C se encuentran por ejemplo en la subunidad β de la fosforilasa quinasa o en la glucógeno sintetasa y en posición B en la piruvato quinasa.

En estudios con péptidos sintéticos variando los aminoácidos en posición C, dos argininas resultan más eficaces que cualquier otra combinación de aminoácidos básicos (127). Cuando se examinan, también con péptidos sintéticos, las posiciones más favorables respecto a la serina fosforilada de las parejas de aminoácidos básicos arginina-arginina y lisina-arginina, la posición óptima para la primera es la B; pero para la segunda es también la B y no la C como sería de esperar a la vista de la secuencias de fosforilación en sustratos naturales (137).

Por último, señalar que aquellos sustratos que contie-

nen restos de arginina adyacentes al sitio fosforilable en posición carboxilo (como la protamina), se fosforilan con baja eficacia por este tipo de enzimas.

1.3.5. Regulación.

1.3.5.1. Acción Hormonal y cAMP

La incidencia de diversas hormonas sobre la proteína -quinasa en tejidos intactos se mide por la alteración de la relación de actividad enzimática en ausencia y en presencia de cAMP/ que es un parámetro indicativo de la extensión de la disociación de la holoenzima. Entre las hormonas y drogas que aumentan esta/ relación de actividad se encuentran, epinefrina, en tejido adiposo y corazón, hormona estimulante del folículo y hormona luteneizante en testículos, glucagon y fenobarbital en hígado, ACTH en/ células adrenales, reserpina y carbamilcolina en médula adrenal y hormona estimulante del tiroides y prostaglandina E_1 en tiroides (9).

Como consecuencia de la determinación "in vivo" de la/ constante de activación, K_a (concentración de nucleótido cíclico necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima) ha surgido una curiosa paradoja acerca de la activación "in vivo" de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Los valores obtenidos para la K_a oscilan alrededor de 10 nM. Teniendo en cuenta que los niveles basales de cAMP en muchos tejidos están comprendidos entre 0.1 - 1.0 μM , la enzima se encontraría totalmente activada en/ estas condiciones y no sería factible la regulación hormonal.

Beavo y col (51 y 138) han demostrado que la K_a varía/

en función de la concentración de enzima cuando ésta es igual o -
mayor que la K_a termodinámica. Este fenómeno ha sido observado -
también por otros investigadores (16 y 99).

Otro posible mecanismo de regulación ligado al cAMP, -
pero que no afecta a sus niveles, es la incidencia que tienen ciertos
agentes sobre la interacción del nucleótido cíclico con la -
subunidad reguladora de la enzima.

Así, por ejemplo, el fragmento tóxico letal de la ---
 α -toxina de estafilococo produce una disminución de la actividad/
fosforilante, y atenúa la estimulación de la relación de activi--
dad de la enzima por epinefrina con un mecanismo de inhibición -
competitivo por el sitio de unión del cAMP (139). El hemo se une/
específicamente a la subunidad reguladora bloqueando la unión del
cAMP por un mecanismo no competitivo (140).

Se ha discutido la posibilidad de que las hormonas pue
dan alterar la actividad de proteína quinasa en células blanco -
por mecanismos distintos de la disociación mediada por cAMP. Así,
la activación de la glucógeno sintetasa por insulina en hígado --
perfundido de rata está acompañada de una disminución de la acti-
vidad proteína quinásica sin que se detecte disminución en la con
centración hepática de cAMP (141). Se ha descrito también que la/
insulina disminuye la relación de actividad quinásica en diafragma
de rata (142) sin que se alteren los niveles de cAMP en este teji
do. Lerner y col (143) han descrito que la insulina puede generar
un inhibidor de proteína quinasa. Parece evidente que la insulina
afecta a la proteína quinasa dependiente de cAMP por mecanismos -
distintos de la disminución de los niveles de cAMP.

Por otra parte, se ha descrito un único tipo de activación para una de las proteína quinasas purificadas de cuerpo lúteo bovino (144). Esta enzima es estimulada directamente "in vitro" - por la adición de hormona luteneizante (LH), la cual no influye - en la unión del cAMP ni es sustrato para la proteína quinasa. Aunque la cantidad de LH necesaria para la activación directa es mayor que la encontrada en condiciones fisiológicas se puede especular acerca de la posibilidad de que hormonas peptídicas (o moléculas similares) puedan penetrar en las células blanco y alterar - directamente la actividad proteína quinásica.

La proteína quinasa dependiente de cAMP de tiroides bovino se inhibe en presencia de 25 μ M de L-triyodotironina (T_3) con una ID_{50} (concentración de inhibidor necesaria para un 50% de inhibición) de 0.1 mM (145). La triyodotironina no inhibe las actividades de proteína quinasa de riñón, bazo o pulmón bovinos. Con la proteína quinasa tiroidea actúa de manera competitiva con el - ATP, con un mecanismo de inhibición similar al descrito para compuestos de adenina (119).

1.3.5.2. Translocación

Otra posible forma de regulación de la proteína quinasa dependiente de cAMP es su translocación celular como ya se ha discutido al abordar el mecanismo de activación de la enzima.

Varios autores han descrito que la elevación de los niveles de cAMP origina una translocación de PQA desde la fracción-soluble de la célula al núcleo (146,147) o a los microsomas (148) Keely y col han encontrado que en homogeneizado de corazón la sub

unidad catalítica liberada por altos niveles de cAMP se une a fracción particulada lo que se puede evitar en presencia de concentraciones fisiológicas de KCl (150 mM). Esta translocación sería pues artefactual y es mucho más pronunciada para la subunidad catalítica que para la holoenzima (149).

Costa y col (146) estudiando la inducción de tiroxina/hidroxilasa en médula adrenal han encontrado que la reserpina disminuye la actividad PQA en fracción soluble e incrementa la cantidad de subunidad catalítica libre en fracción particulada. Este comportamiento se observa aun cuando el tejido se homogeniza con/tampón conteniendo 0.15 M de NaCl. La especificidad de la proteína translocada es distinta de la actividad endógena presente en la fracción particulada.

Se puede concluir que aunque se ha demostrado que la translocación tanto de la holoenzima como de la subunidad catalítica puede ocurrir "in vivo" en determinados casos, no se ha podido demostrar que este proceso esté implicado en fenómenos reguladores.

1.3.5.3. Regulación por MgATP

La incidencia del MgATP sobre PKI a través del sitio de alta afinidad en la holoenzima y sobre PKII mediante la autofosforilación de su subunidad reguladora ha sido ampliamente comentada en anteriores apartados.

1.3.5.4. Proteínas moduladoras

Beavo y col (138) sugieren que proteínas de pequeño ta-

maño pueden desempeñar un importante papel regulador y contribuir a la especificidad de la fosforilación.

Una proteína inhibidora de la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP ha sido parcialmente purificada por Walsh y col a partir de músculo esquelético de conejo (150). Este inhibidor tiene carácter ácido con un pI de 4.1, precipita, pero no se inactiva con TCA al 5%, es estable a 95° C, con un peso molecular aparente en Sephadex 6-75 de aproximadamente 26.000D.

Posteriormente, Demaille y col lo han purificado hasta homogeneidad a partir de músculo esquelético (151) y cerebro (152). El preparado homogéneo tiene 98 aminoácidos, con el N terminal bloqueado, y un peso molecular, de 11.300 D, menos de la mitad del valor originalmente determinado por Walsh y col (150) y aproximadamente la mitad del valor determinado por Weber y Rosen (153) para el inhibidor de corazón bovino. La razón de esta discrepancia parece residir en el estado de agregación:

Recientemente Walsh y col (154) han encontrado que en músculo de conejo, el inhibidor proteico puede existir en dos formas I e I' de peso molecular aparente 22.000 y 11.000 D, cada una de ellas con tres isómeros de carga. Según estos autores, ambas formas tienen peso molecular y composición idénticas pero distinta conformación sin que ésta afecte a la función inhibidora ya que la Ki de ambas es idéntica.

El inhibidor purificado por Demaille y col hasta homogeneidad (151 y 152) que correspondería a la forma I' de Walsh,

se ha podido separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de cambio iónico en tres especies isoinhibidoras A, B y C del mismo peso molecular, punto isoelectrico y sin fosfato unido covalentemente, que difieren entre sí por su potencia inhibidora, sensiblemente más debil para la forma C (K_i 0,87 nM) que para A y B (K_i 0.13 y 0.23 nM, respectivamente).

La proteína inhibidora, I, bloquea la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP por interacción directa con la subunidad catalítica libre, C, formando un complejo inactivo C-I inhibidor-subunidad catalítica, (156 y 157), fácilmente reversible (157). Recientemente, utilizando cromatografía de cambio -- iónico para resolver C del complejo C-I se ha demostrado que el/ Mg.ATP favorece la formación de este último (158).

La afinidad del inhibidor por C es muy elevada (K_i 2nM) y su mecanismo de actuación es competitivo con respecto a la - proteína sustrato (151).

En la actualidad ha quedado claramente establecida la/ importancia que tienen los restos básicos, particularmente de arginina, en el reconocimiento del inhibidor por parte de la subunidad catalítica (151). Recientemente (158), se ha demostrado que guanetidina y guanidinobenzimidazol son inhibidores competitivos de la actividad enzimática con respecto a las proteínas o péptidos sustratos con valores de K_i de 3 y 4 nM respectivamente. Los compuestos de guanidinio compiten con el grupo arginilo del sus--trato. Estos resultados indican que tanto la subunidad reguladora como la proteína inhibidora se unen al dominio correspondiente a la proteína sustrato en la subunidad catalítica.

Demaille y col (159) explican la gran afinidad de la - proteína inhibidora por la subunidad catalítica sobre la base de la existencia de dos puntos de anclaje en el inhibidor. La región N terminal interaccionaría con el sitio de unión de la proteína/ sustrato, mientras que la porción C terminal estaría unida a otra parte no determinada de la subunidad catalítica.

Además de su gran afinidad, la proteína inhibidora presenta una gran especificidad por la subunidad catalítica de la - proteína quinasa dependiente de cAMP, puesto que ninguna otra - proteína quinasa, incluyendo la PQG, se inhibe por esta proteína/ (152,160 y 161) lo que está de acuerdo con la hipótesis de que - la especificidad de sustratos de ambas enzimas es diferente (57). Por su alta especificidad, el inhibidor se utiliza para distin-- guir PQA de otras proteína quinasas (162) y las proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos de las subunidades catalí- ticas libres de PQA (6).

La baja concentración de proteína inhibidora en dife-- rentes tejidos (aproximadamente 50 nM) solo es capaz de inhibir/ un 12-20% de la cantidad total de subunidad C que puede originar se por disociación de PQA (151 y 163) lo que induce a pensar que el papel fisiológico del inhibidor podría ser la neutralización/ de los niveles basales de cAMP cuando el tejido no está bajo es- timulación hormonal (138).

Un dato de interés en el orden regulador es que la con centración del inhibidor proteico puede variar en diferentes si- tuaciones fisiológicas (163-165).

Szmigielski y col (166) y Costa (165) han obtenido a partir de cerebro de rata un inhibidor no precipitable por TCA - al 5%, de aproximadamente 15.000 D, que compite por la enzima - con varios sustratos siendo su característica más sobresaliente/ su capacidad de inhibir no sólo la PQA sino también la PQG y algunas otras proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos. Se han descrito otras especies de inhibidor con propiedades similares pero diferente peso molecular y/o tamaño (167).

Un tercer tipo de inhibidor de proteína quinasa dependiente de cAMP (K_i 11nM) ha sido purificado hasta homogeneidad - a partir de testículo de rata en donde se encuentra en una concentración 0.3 μ M (168). Presenta analogías con el inhibidor de conejo en cuanto a su peso molecular, 26.000 D, y su carácter ácido (pI 4.4) pero difiere de éste en su composición de aminoácidos y en su capacidad de inhibir la fosfodiesterasa de cAMP.

1.3.5.5. Efecto de diversos sustratos y péptidos no sustratos

Se ha descrito que sustratos como histona y protamina/ (63,66 y 169) y otros policationes no sustratos como poli-L-arginina (16) promueven la disociación y activación de muchas preparaciones de proteína quinasa.

Sin embargo, polianiones como poli-L-glutámico o poli-L-aspartico inhiben la actividad de proteína quinasa con histona como sustrato, siendo este efecto más potente en presencia - que en ausencia, de cAMP (48) y no observándose cuando se utilizan otros sustratos como caseína, por lo que se puede concluir - que su efecto inhibitor se debe a la interacción con los policationes sustratos (por ejemplo histona) y no con la propia enzi-

ma.

Por otra parte, los policationes histona, protamina, - poli-L-arginina y poli-L-lisina aumentan la unión del cAMP a la holoenzima (66 y 170). Beavo y col (138) han demostrado que cuando se utilizan histonas como sustrato, la K_a para el cAMP es considerablemente más baja que para otros sustratos como caseína o glucógeno sintetasa, aunque este efecto se puede deber en gran parte a la disociación provocada por la histona. Los policationes poli-L-glutámico y poli-L-aspartico suprimen el efecto estimulador de la histona, poli-L-arginina y poli-L-lisina sobre la unión del cAMP, aunque no disminuyen los niveles basales de unión (170).

1.3.5.6. Efecto de las poliaminas

Se ha descrito la inhibición de la proteína quinasa dependiente de cAMP por poliaminas como espermidina, espermina y putrescina (161 y 171). Su efecto es debido a la inhibición de la subunidad catalítica sin que se afecte en absoluto la unión del cAMP a la holoenzima.

Parece que la regulación de PQA por poliaminas es un fenómeno general que puede tener importancia en el crecimiento celular y una mayor significación fisiológica en aquellos órganos que, como el hígado, son ricos en poliaminas.

1.3.5.7. Acción de diversos agentes químicos y farmacológicos

Una serie de agentes farmacológicos actúan sobre la -

actividad de proteína quinasa lo que puede guardar relación con/ algunos de los efectos de estos productos "in vivo".

Se ha descrito que la morfina inhibe la proteína quinasa dependiente de cAMP (172) y se ha estudiado el efecto sobre la proteína quinasa del tratamiento crónico con morfina (173). Las/ proteína quinasas parecen desempeñar un papel importante en la - acción de los opiáceos en el cerebro (174).

La tolbutamida, una sulfonil urea que se utiliza como/ hipoglucemiante oral, inhibe la actividad proteína quinásica de- pendiente de cAMP en tejido adiposo (175) y glándula paratiroidea de rata (176) a concentraciones de 4 y 10 mM respectivamente. Uti- lizando preparados de proteína quinasa parcialmente purificados/ a partir de glándula paratiroidea bovina se ha demostrado que la tolbutamida y su carboxiderivado inhiben la actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP, (sin que tenga un efecto significa- tivo en ausencia del mismo) y la actividad de proteína quinasa - independiente de nucleótido cíclico (177). En cuanto al mecanis- mo de inhibición se ha demostrado que la tolbutamida aumenta la/ Km para el ATP y la Kd para cAMP sin que ejerza efecto alguno so- bre la Km para la histona (177).

La diamida (bis -N,N - dietilamida del ácido azodicar- boxílico) que inhibe una serie de importantes procesos como la - síntesis de ácido ribonucleico , síntesis de proteínas y trans- porte de aminoácidos y azúcares inhibe reversiblemente también - la proteína quinasa dependiente de cAMP de una serie de tejidos/ de mamíferos (178 y 179) y del cuerpo graso de langosta (*Locusta migratoria*) (180) en donde también se ha encontrado inhibición - sobre PQG. La ID₅₀ (concentración necesaria para un 50% de inhi-

bición) oscila entre 1 y 50 mM.

De acuerdo con Pillion y col (179), la diamida inhibe/ la holoenzima y la subunidad catalítica de la proteína quinasa de pendiente de cAMP uniéndose a áreas hidrofóbicas de la superficie de la enzima y formando complejos inactivos.

La indometacina, un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, inhibe la proteína quinasa dependiente de cAMP - (181 y 182). La inhibición se produce a concentraciones submicro-molares con ID_{50} de 17 nM y 48 nM en ausencia y presencia de cAMP respectivamente, utilizando una preparación de proteína quinasa - parcialmente purificada de íleon de conejo (181). La inhibición - no puede ser revertida por dilución del inhibidor sugiriendo que/ es irreversible o que se une a la enzima de forma extraordinaria- mente potente. No se conoce el mecanismo de inhibición.

Otro agente farmacológico que inhibe la proteína quina- sa dependiente de cAMP es el ester isoamílico de la eritadenina,/ que es un agente hipolipidémico muy potente derivado de la erita- denina (ácido 2(R), 3(R) -dihidroxi-4- (9-adenil) - butírico), - con un anillo de adenina en su molécula (183). Esta fármaco, que/ también inhibe la fosfodiesterasa de cAMP, ejerce su efecto sobre la PQA por una inhibición competitiva con el ATP. Mediante un me- canismo similar actúan las drogas nucleosídicas anticancerosas - cordicepina (3-deoxiadenosina) y xiloxiladenina (9- β -D-xilofura nosil adenina), si bien su efecto se ha demostrado en la fosfori- lación de proteínas cromosomales no histonas por proteína quina- sas nucleares independientes de nucleótidos cíclicos (184 y 185).

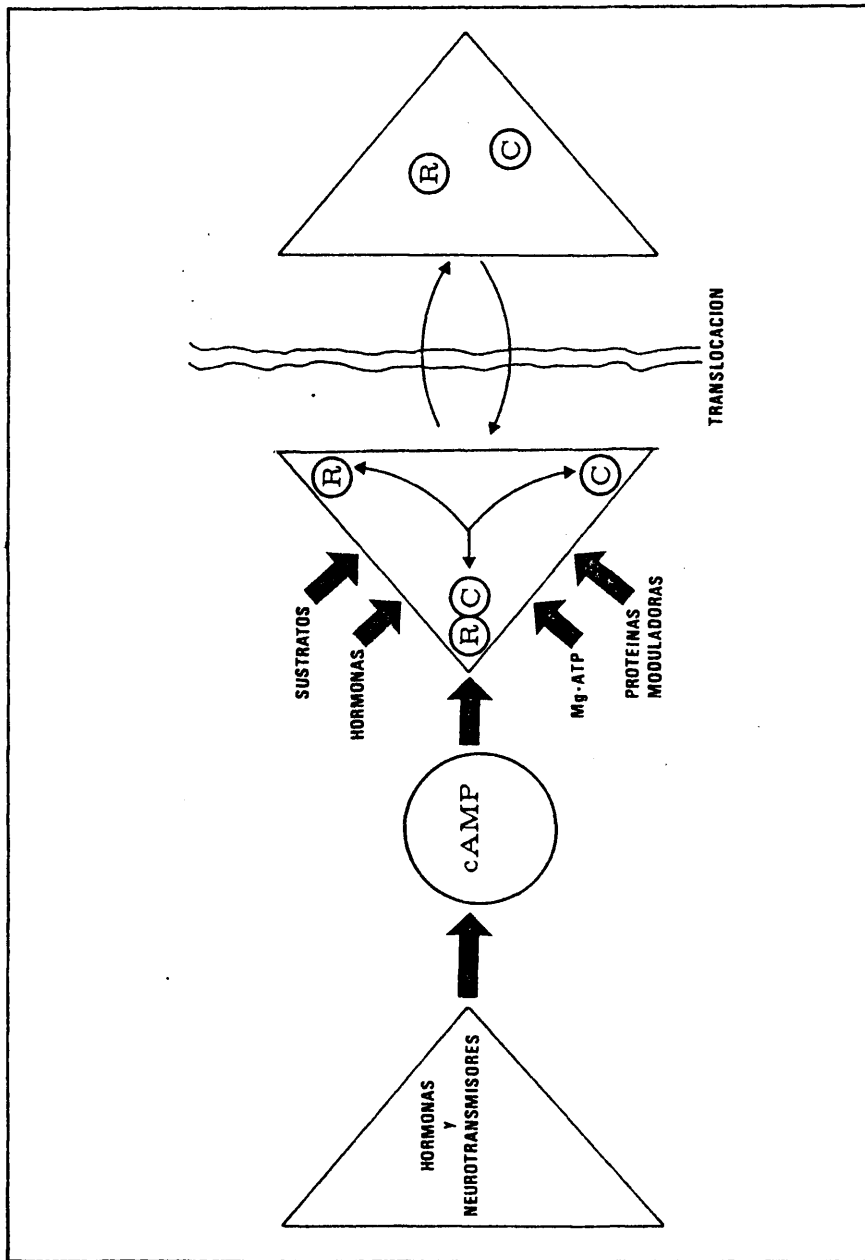


FIG. 7.- Regulación de las proteína quinasas dependientes de cAMP. R es la subunidad reguladora y C la subunidad catalítica.

Recientemente se ha descrito la inhibición de la proteína quinasa dependiente de cAMP por el colorante "azul ciba---crón F3GA", el grupo que lleva la "Sepharosa azul", al interactuar con el centro activo de la enzima y competir con el ATP (186).

En la FIG 7 se esquematiza el efecto regulador de diversos agentes sobre la proteína quinasa dependiente de cAMP.

1.4 Proteína quinasas dependientes de cGMP (PQG)

1.4.1. Sistema proteína quinasa -cGMP

Aunque cAMP y cGMP ejercen una influencia reguladora opuesta en ciertos sistemas controlados bidireccionalmente (Ying-Yang), se han descrito numerosas excepciones y muchos de los postulados propuestos por Sutherland y col para la mediación por cAMP de la respuesta hormonal, no se cumplen en su totalidad para el cGMP (187).

El nivel de cGMP se incrementa en diversos tejidos de mamíferos en respuesta a la estimulación por determinado número de hormonas y neurotransmisores entre los que se cuentan acetilcolina, histamina, norepinefrina, epinefrina, ácido glutámico, insulina y estrógenos, por lo que parece razonable la existencia de una enzima blanco para este nucleótido cíclico en células de mamíferos.

Por analogía con la proteína quinasa dependiente de cAMP y teniendo en cuenta que la proteína quinasa dependiente de cGMP (PQG) es el receptor con más alta afinidad por el cGMP, se ha establecido que esta enzima media las acciones de este nucleo-

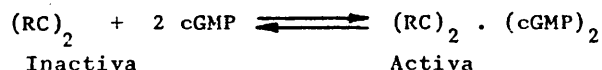
tido cíclico (188-190).

Kuo y Greengard (188) describieron por vez primera una proteína quinasa que se activaba por cGMP en músculo de langosta y Hofmann y Sold (191), identificaron actividad de PQG en un tejido de mamífero (cerebro de rata). Posteriormente se ha estudiado este tipo de enzima en varias especies de artrópodos (189) y tejidos de mamíferos (160,192-197).

1.4.2. Características moleculares: subunidades, estequiometría/ y mecanismo de activación.

El peso molecular de la proteína quinasa dependiente de cGMP de varios tejidos de mamíferos se ha estimado entre 120.000 y 165.000 D, con coeficientes de sedimentación comprendidos entre 7.1 y 7.8 S (160 y 192-197).

Su estructura es dimérica y la unión del cGMP y activación correspondiente de la fosforilación ocurre sin disociación de las subunidades:



con las actividades receptora de cGMP y catalítica presentes en la especie monomérica (160,161 y 198).

Se unen dos moles de cGMP por mol de enzima en el equilibrio (197,199 y 200), correspondiendo 1 mol de cGMP por cada subunidad.

Debido a este mecanismo de activación y contrariamente a lo que ocurre con la PQA, la holoenzima de PQG se puede purificar por cromatografías de afinidad con nucleótidos cíclicos inmovilizados (160,196,198-200).

Sobre la base de las consideraciones teóricas discutidas por Monod y col para proteínas alostéricas, se ha propuesto/ que la PQG es un dímero que consta de dos protómeros en asociación isóloga con las cadenas dispuestas de forma antiparalela. - En la FIG. 8 se muestra un modelo de la estructura y activación de la PQG (56).

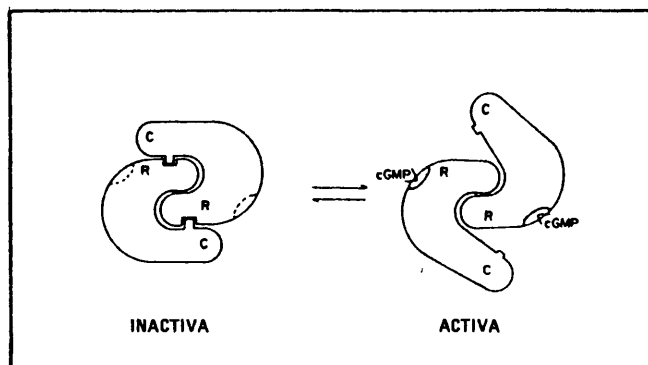


FIG.8.- Modelo de la estructura y mecanismo de activación de la proteína quinasa dependiente de cGMP.(56).

Cada subunidad tiene un dominio regulador (R) cuya función es inhibir el dominio catalítico (C). El sitio inhibidor contiene una porción análoga al sustrato (dos restos de arginina y/ uno de serina) que interacciona con el dominio catalítico del protómero isólogo merced a la existencia de un eje de simetría en la estructura dimérica.

La unión del cGMP exhibe cooperatividad positiva de tal

forma que la unión del cGMP al primer sitio facilita la unión al segundo sitio del dímero. Al interaccionar el cGMP con la enzima, se relaja la estructura y desaparece el bloqueo de R sobre C con lo que la quinasa se activa.

La PQG purificada de pulmón bovino es un dímero con un peso molecular estimado entre 150.000 -165.000 D (160,197 y 199). Enelectroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en ausencia de agente reductor aparece una banda de peso molecular 150.000. - Cuando se añade ditiotreitól o 2-mercaptoetanol, aparecen dos - bandas de peso molecular 74.000, indicando que los puentes disulfuro están implicados en la unión de las dos subunidades para - formar la holoenzima.

Los estudios de la autofosforilación de PQG por un mecanismo intramolecular (ver apartado 1.4.6.3.) han ayudado a la determinación de la estructura de la PQG. Lincoln y col (198) han observado que la 2,3 -butanodiona, que se une covalentemente a - los restos de arginina, bloquea la autofosforilación y han propuesto que el sitio de autofosforilación es la porción análoga - al sustrato que interacciona con el sitio catalítico de PQG (198).

En presencia de cGMP, 2,3 -butanodiona y 2 -mercaptoetanol tiene lugar la disociación de la enzima en sus subunidades, - lo que indica que ambas cadenas están unidas por puentes disulfuro y por interacciones de carga que incluyen las argininas presentes en la región autofosforilada de la porción reguladora de la molécula.

Cuando se une el cGMP a la enzima, el sitio de autofos-

forilación se separa del centro catalítico pero la enzima no se disocia por la existencia de los puentes disulfuro entre ambos monómeros.

La estructura propuesta para PQG es compatible con una proteína alostérica dimérica y está de acuerdo con los datos disponibles de la enzima purificada.

Hasta muy recientemente, sin embargo, diversos autores sostenían un modelo de disociación de subunidades para PQG similar a PQA (196 y 201-203). Utilizando PQG parcialmente purificada de músculo de langosta (7.7 S), se ha observado la generación de una porción catalítica de pequeño tamaño (3.6 S) cuando se incubaba la enzima con altas concentraciones de histona y cGMP (202 y 203). Un resultado similar se ha obtenido con la PQG de pulmón fetal de cerdo (194), corazón fetal de ternera (195) y aorta bovina (196), resultando esencial la presencia conjunta de histona y cGMP; ya que la disociación producida en presencia de cada uno de ellos por separado es muy pequeña. El cAMP, en presencia de histona, es incapaz de sustituir a similares concentraciones de cGMP en su efecto disociante.

Las denominadas "subunidades catalíticas", que no son estimuladas ni unen cGMP, aisladas de aorta y pulmón fetal, se inhiben por la subunidad reguladora de PQA de corazón bovino (196). Unos resultados similares se obtienen con la "subunidad" de PQG de langosta, con formación en ambos casos de una holoenzima "hibrida" dependiente de cAMP.

Estos resultados han inducido a pensar que el mecanismo

de activación de PQA y PQG son similares, sin embargo, algunos - datos son difíciles de explicar como por ejemplo, que la "subuni-
dad reguladora", receptora de cGMP, no se ha recuperado nunca de la holoenzima supuestamente disociada. Además, se requieren al-
tas concentraciones de cGMP para que la "disociación" se lleve a cabo ($50 \mu\text{M}$ o mayor) y esta no ocurre a una concentración de -- cGMP, en presencia de histona, de $0.5 \mu\text{M}$ que es la requerida para la máxima activación de PQG.

Inoue y col (204) mediante proteólisis limitada de PQG de gusano de seda (140.000 D) han obtenido un fragmento catalíti-
co (34.000 D) independiente de cGMP y un fragmento (36.000 D) en el que reside la actividad receptora de cGMP. Lincoln y col (198) también han observado la activación de PQG de pulmón bovino por - proteólisis limitada. Como discuten Shoji y col (196), es posi-
ble que la subunidad catalítica se produzca a consecuencia de una ruptura proteolítica de la holoenzima. La impureza de los prepara-
dos enzimáticos, así como la alta concentración de histona utilizada, son fuentes potenciales de actividad proteolítica.

1.4.3. Distribución

El alto contenido de cGMP encontrado en tejidos de in-
sectos (205) y el descubrimiento de niveles comparables de PQG y/
PQA en artrópodos (188 y 189), sugieren la posibilidad de una fun-
ción preponderante del sistema cGMP en estos organismos. Un mate-
rial interesante es la larva de gusano de seda, Bombyx mori, que
contiene exclusivamente actividad de PQG (206).

En mamíferos, por el contrario, la PQA es mucho más -

abundante que la PQG, en estrecha correlación con los bajos niveles de cGMP existente en la mayoría de los tejidos examinados (207). Pulmón y cerebelo son los que contienen más altas concentraciones de cGMP (207), encontrándose asimismo tanto en uno (190 y 208) como en otro (192 y 209) las mayores proporciones de PQG en mamíferos. Otra fuente importante de actividad de PQG es la arteria femoral (210). Sin embargo, sólo en el pulmón fetal y neonatal la relación PQG/PQA excede la unidad (208). Durante la vida adulta PQG declina y PQA aumenta, invirtiéndose la relación.

Muchos otros tejidos como corazón, hígado, cerebro, venas, aorta, riñón, adiposo, intestino, islotes pancreáticos, vejiga y útero, contienen cantidades significativas de PQG pero sus niveles son sólo del 5-20% de los de PQA (160, 190, 195 y 208). El músculo esquelético es probablemente el único tejido que no contiene una detectable actividad PQG en las condiciones de ensayo estandar (190).

En cuanto a su distribución subcelular se ha encontrado la mayoría de la actividad PQG en la fracción soluble de un cierto número de tejidos (190, 208 y 210) y sólo una pequeña porción se encuentra asociada con la fracción particulada.

1.4.4. Propiedades físicas e inmunológicas

Los datos más definitivos disponibles son los obtenidos con la enzima homogénea de pulmón bovino (197). Su peso molecular es de 150.000 D y está compuesta de dos cadenas polipeptídicas de peso molecular 74.000. El radio de Stokes es de 50 Å. La enzima es, como la PQA, muy asimétrica con un coeficiente --

friccional de 1.42 y una relación axial de 7.4 (elipsoide oblató). Su punto isoelectrico (5.4) es ligeramente superior al de la PQA/ (5.1). La PQG cromatográfica en DEAE-celulosa entre las isoenzimas tipos I y II de PQA.

En cuanto a las propiedades inmunológicas, se han observado diferencias sustanciales entre PQG y PQA (211). Un antisuero preparado en conejo frente a PQG de pulmón bovino, inhibe específicamente la actividad histona quinasa y la autofosforilación de la enzima sin afectar al sitio receptor de cGMP. Este antisuero / también inhibe específicamente la fosforilación de proteínas sustratos endógenas por PQG en membrana de músculo liso pero no se cruza con las subunidades catalíticas o reguladoras tipos I o II/ de PQA.

De la misma forma, antisueros frente a las subunidades/ reguladoras I y II de PQA no se cruzan con la PQG.

Estos resultados, demuestran diferencias antigénicas - entre PQA y PQG en las porciones reguladoras y catalítica de ambas enzimas.

1.4.5. Características de la unión del cGMP a PQG

En los primeros estudios utilizando PQG parcialmente purificado de cerebelo de rata (212), corteza adrenal bovina (213), y pulmón de rata (214) se describe una única clase de sitios receptores de cGMP, sin interacción entre los mismos.

Recientemente (215), se ha estudiado la interacción -- del cGMP con PQG concluyendo que existe cooperatividad positiva

en la unión que se ve afectada por el pH, temperatura y ATP.

El ATP reduce la afinidad de PQG por el cGMP mediante un mecanismo no competitivo con el sitio receptor del cGMP. Parece por el contrario, que la interacción del ATP con el sitio catalítico correspondiente, origina un cambio conformacional en PQG que altera la capacidad de interacción del cGMP con el sitio regulador. En apoyo de esta hipótesis, la concentración necesaria de ATP para alcanzar la mitad del efecto máximo ($10 \mu\text{M}$) es similar a la K_m para el ATP de la PQG (161 y 197) y además este efecto es específico del ATP.

1.4.6. Reacción catalítica

1.4.6.1 Cinética

Las histonas son los sustratos utilizados más frecuentemente en ensayos "in vitro". El ATP es el único donador de fosforilo descrito para PQG (193).

De los cationes divalentes probados, Mg^{2+} y en menor proporción Co^{2+} , son los más efectivos, satisfaciendo los requerimientos de PQG de distinta procedencia. Se ha descrito la necesidad de incluir altas concentraciones de Mg^{2+} ($50-100\text{mM}$) en el ensayo de diversas PQG (160, 161, 192, 193 y 199). Sin embargo para la PQG homogénea de pulmón bovino la concentración óptima de Mg^{2+} se sitúa entre $5-10 \text{ mM}$ (197). La concentración óptima de catión divalente puede variar con el tipo de sustrato empleado. -- Flockerzi y col (200) han descrito que para la fosforilación de una mezcla de histonas por parte de PQG es de 2mM de Mg^{2+} mien--

tras que para la fosforilación de H2B se sitúa alrededor de 60 mM. Las altas concentraciones de Mg^{2+} son importantes para la disociación de la enzima de la histona H2B fosforilada pero no para la propia reacción de fosforilación. También se han descrito concentraciones óptimas de Mg^{2+} de 2 - 5 mM con sustratos distintos de las histonas (216).

La presencia de una proteína moduladora de la actividad PQG también puede significar un factor importante respecto a la concentración óptima de Mg^{2+} (ver apartado 1.4.8).

Aunque la concentración de Mg^{2+} requerida para la fosforilación de la histona H2B por PQG del pulmón bovino es baja, la enzima permanece activa a 50 mM de Mg^{2+} . Por el contrario, la fosforilación de histona por PQA se inhibe a altas concentraciones de Mg^{2+} . La distinta respuesta de la enzima a altas concentraciones de Mg^{2+} se ha utilizado para diferenciar actividades de PQG y PQA de preparados enzimáticos impurificados (217).

El activador más potente de PQG es el 8-bromo cGMP. El cGMP es 100 veces más efectivo que el cAMP o cIMP en reducir la unión del $[^3H]$ cGMP al sitio regulador de PQG de pulmón bovino, -- mientras que dibutiril cGMP y 2',3' -cGMP son mucho menos efectivos y otros nucleótidos ensayados resultan totalmente ineficaces/ a excepción del ATP (215). El efecto del cGMP es incrementar la $V_{m\acute{a}x}$ de forma análoga a la acción ejercida por el cAMP sobre PQA/ (63). Kuo y col (193) han descrito una disminución de la K_m para el ATP, además de un aumento en la $V_{m\acute{a}x}$, por efecto del cGMP.

El pH óptimo es dependiente del sustrato. Con histona/H2B la máxima dependencia de cGMP se observa a pH 5.7-7.0 (197). Es de destacar que en los valores más altos de pH de este intervalo, la actividad basal se aproxima a la actividad total en presencia de cGMP. El pH óptimo para la fosforilación de la troponina cardíaca se sitúa entre 8.0-9.0 (218).

1.4.6.2. Especificidad de sustrato

La especificidad de PQG hacia proteínas o péptidos sustratos es similar, aunque no idéntica, a la de PQA como han confirmado trabajos realizados con péptidos sintéticos (57, 219 y 220).

La PQG cataliza "in vitro" la fosforilación de las cinco fracciones de histonas (221). Tres subfracciones de histonas estudiadas (H1, H2B y H3) exhiben mayor afinidad por PQG que por PQA, utilizando enzimas de diversos tejidos (193, 195 y 196).

Se ha demostrado que péptidos correspondientes a los sitios de fosforilación alrededor de serina 32 y 36 en histona H2B muestran diferentes "preferencias" relativas por PQG y PQA (220), estando de acuerdo con las observaciones previas de Hashimoto y col (222) con las proteínas intactas.

La PQG fosforila preferentemente las histonas H1 y H2B y muy lentamente H2A, H3 y H4 en ausencia de estimuladores polianiónicos. Estudios recientes (223) han revelado que la fosforilación de histona por PQG aumenta considerablemente por polidesoxirribonucleótidos de una o dos cadenas sin que aparentemente haya especificidad de bases aunque las pirimidínicas son ligeramente más efectivas que las púricas. La estimulación no es específica de los polidesoxirribonucleótidos sino que otros polianiones co-

mo los polirribonucleótidos poli-A y poli-G, polipeptidos ácidos como poliglutamato y poliaspartato y polisacáridos ácidos como heparina pueden también estimular la fosforilación de histonas. Parece que la interacción iónica entre el factor polianiónico y la histona conduce a un sustrato más efectivo para PQG y la máxima velocidad de reacción se alcanza cuando se usan iguales cantidades de histona y polidesoxirribonucleótidos, lo que está de acuerdo con las evidencias disponibles de que las nucleohistonas son -- mejores sustratos para PQG que las histonas libres. Los polidesoxirribonucleótidos aumentan la fosforilación de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y no tienen efecto estimulador cuando se utiliza la histona H1 como sustrato.

Así, es posible suponer que PQG puede estar implicada -- directa e indirectamente en los procesos de regulación genética a través de la fosforilación de histonas integradas en la estructura del nucleosoma. En experimentos realizados con PQA e histona -- H2A como sustrato, la fosforilación se ve considerablemente disminuida en presencia de polidesoxirribonucleótidos. Es de destacar/ que cuando se emplea como sustrato la fosforilasa quinasa, la fosforilación por parte de PQG y PQA no se afecta por polidesoxirribonucleótidos (223). Aunque estudios iniciales con preparaciones/ parcialmente purificadas de PQG indicaban que la enzima no puede/ fosforilar las enzimas interconvertibles sujetas a regulación por PQA; estudios posteriores han revelado que "in vitro" PQG fosfori la las mismas proteínas sustratos que PQA como son piruvato quina sa, glucógeno sintetasa, fosforilasa B quinasa, lipasa sensible a hormonas, colesterol esterasa, fructosa -1.6- difosfatasa, tropo- nina cardíaca y ciertas proteínas ribosomales y además la fosfori lación se da en el mismo sitio, aunque con más eficacia con PQA -- que con PQG.

Aunque existe un solapamiento en la especificidad hacia el sustrato "in vitro", "in vivo" existe un alto grado de especificidad funcional. El reconocimiento enzima-sustrato difiere "in vivo" lo suficiente como para que la fosforilación de sustratos por PQA no ocurra cuando se activa PQG. Así, por ejemplo, -- "in vivo" la fosforilación de la troponina ocurre en respuesta a incrementos en la concentración de cAMP, pero no de cGMP (224)./ En esta misma línea se encuentra el hecho de que fosforilasa quinasa y triglicérido lipasa sensible a hormonas, sustratos bien - caracterizados para PQA "in vitro" e "in vivo", sólo son fosforilados por PQG "in vitro".

Presumiblemente con los sustratos de PQG debe ocurrir/ otro tanto, aunque su existencia no ha sido demostrada inequívocamente. En experimentos en los que ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP y cGMP se incuban/ con fracciones celulares de intestino delgado y conducto deferente, útero y cerebelo, se han separado mediante electroforesis -- proteínas específicamente fosforiladas cuya función se desconoce (225-227).

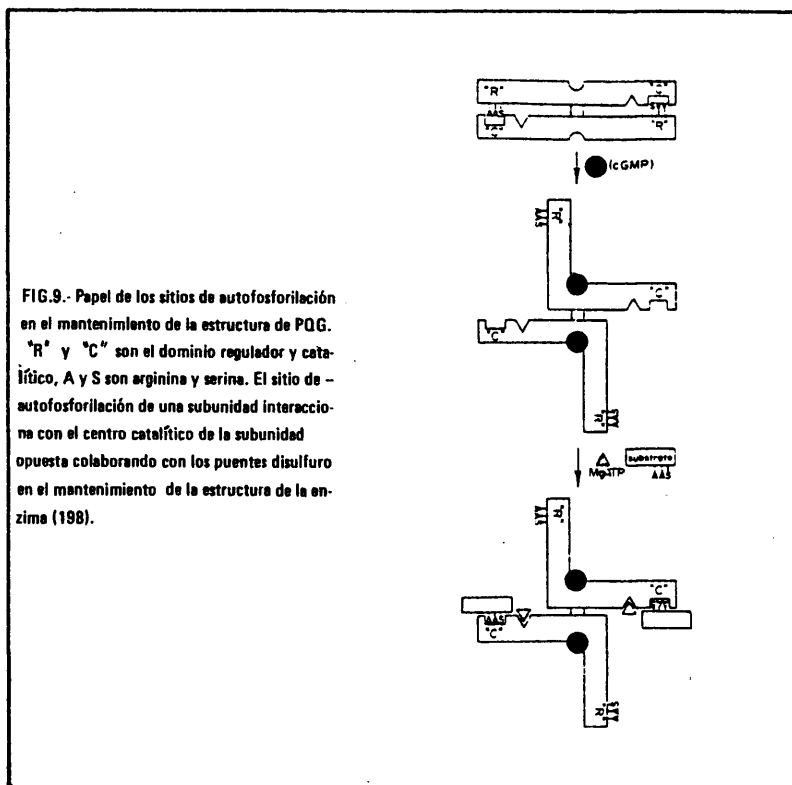
Recientes estudios (228 y 229) con músculo liso vascular (aorta de conejo) indican que los sustratos endógenos de PQG son proteínas componentes de la membrana plasmática, mientras - que la propia enzima existe tanto en forma soluble como asociada a la membrana plasmática. La compartimentalización celular de las proteínas sustratos y de la enzima es un importante factor a tener en cuenta en las especificidades catalítica y funcional de - las proteína quinasas.

1.4.6.3. Autofosforilación

La PQG experimenta autofosforilación (230) incorporándose dos (198) o cuatro (231) moles de fosfato por mol de enzima dimérica mediante un mecanismo intramolecular. La subunidad catalítica de PQA también cataliza la fosforilación de PQG en el mismo residuo de serina demostrándose con ello la posibilidad alternativa de un mecanismo intermolecular. De la misma forma, PQG cataliza la fosforilación de la subunidad reguladora de PQA tipo II.

Recientemente (231), se ha visto que la subunidad reguladora tipo I de PQA (RI) sirve también como sustrato para PQG - incorporándose 2 moles de fosfato por mol de dímero de RI en presencia de cAMP. La reacción de fosforilación es estimulada por cGMP cuando se emplea RI-cAMP como sustrato, pero no cuando se utiliza RI libre. Esta última forma de la subunidad reguladora actúa como un inhibidor competitivo de la fosforilación de la histona H2B y de péptidos sustratos por parte de PQG así como de la reacción de autofosforilación. El efecto inhibidor es revertido/ por el cAMP.

El cGMP inhibe la autofosforilación (198,211 y 230) en virtud de los cambios conformacionales que se producen en la enzima como consecuencia de la interacción de este nucleótido cíclico con su sitio receptor en la misma y que se concretan en un alejamiento del dominio regulador del centro catalítico (FIG.9).



Algunos autores describen que cAMP y cIMP estimulan la autofosforilación (216) pero según otros el cAMP no tiene un efecto significativo (211).

Lincoln y col (198) han descrito que la 2,3-butanodiona así como una proteólisis limitada con tripsina impiden la autofosforilación de PQQ actuando sobre los restos de arginina situados en la posición amino terminal de la serina fosforilable con lo que se pierden los determinantes de especificidad del sitio de autofosforilación. Estos resultados son básicamente similares a

los observados con la subunidad reguladora de PQA, cuya proteólisis inhibe la autofosforilación y la recombinación con la subunidad catalítica (58).

Como ya se ha mencionado, existe una estrecha relación/ entre la autofosforilación de PQA y la velocidad de reasociación/ de sus subunidades. Sin embargo, el papel de la autofosforilación/ en la regulación de la PQG se desconoce. No obstante, como la autofosforilación de PQG en el estado basal es más pronunciada que en el estado cGMP-activado, la autofosforilación podría implicar/ una inhibición de la enzima. Por otra parte, puesto que la fosforilación de restos de serina situados junto a restos de arginina/ disminuye la capacidad de hidrólisis del enlace peptídico por proteasas (222), es posible que la autofosforilación esté relacionada con el recambio de estas quinasas en la célula.

1.4.7. Activación de PQG "in vivo"

Aunque con pocos datos disponibles y con bastante variación entre los mismos, se puede afirmar que la concentración de cGMP en diversos tejidos es igual o algo mayor que la concentración de PQG (11).

Puesto que las concentraciones celulares de cAMP en mamíferos (0.1. μM o más altas) exceden a las de cGMP en por lo menos 10 veces, aquel nucleótido cíclico podría estimular la fosforilación de las histonas por PQG ya que sólo se requiere "in vitro" concentraciones 25 veces superiores de cAMP sobre cGMP para alcanzar la mitad de la fosforilación máxima (216).

Un grado mucho más alto de especificidad respecto del -

nucleótido cíclico se ha descrito cuando se emplea como sustrato lipasa sensible a hormonas, fosforilasa quinasa o troponina cardíaca (216). Así, por ejemplo, con triglicérido lipasa sensible a hormonas como sustrato, se requiere una concentración 1000 veces más alta del nucleótido cíclico opuesto, tanto para PQG como PQA, para conseguir la mitad de la activación máxima.

Este elevado grado de especificidad por nucleótido cíclico observado "in vitro" con otros sustratos distintos de la histona, está de acuerdo con la especificidad descrita "in vivo", donde la elevación de los niveles de cGMP no está asociada con las respuestas biológicas a los incrementos del cAMP (224).

El uso de sustratos con los que la proteína quinasa muestra alta especificidad por nucleótidos cíclicos, permite una sensible detección de cada enzima de una mezcla de ambas, diferencia que se hace todavía más precisa en presencia del inhibidor de PQA, pudiéndose de esta forma controlar el grado de contaminación por PQA de preparados enzimáticos obtenidos a lo largo de la purificación de PQG (216).

1.4.8. Proteína moduladora

Donnelly y col (232) describieron por vez primera y purificaron a homogeneidad a partir de músculo de langosta una proteína estable a ácido y calor, que denominaron modulador de proteína quinasa en base a su ambivalente capacidad de inhibir la enzima dependiente de cAMP y estimular la dependiente de cGMP.

En una serie de experimentos utilizando diversos tejidos de mamíferos (aorta, corazón, pulmón, músculo esquelético, --

intestino delgado y testículos), se ha aislado el modulador crudo obtenido en sus componentes estimulador e inhibidor mediante filtración en gel (223 y 224) mientras que ambas actividades eluyen conjuntamente cuando se cromatografía el inhibidor de langosta en las mismas condiciones (223).

Sobre esta base se ha concluido que las actividades -- inhibidora y estimuladora corresponden a proteínas distintas presentes en las preparaciones crudas del modulador obtenido de mamíferos y que en langosta ambas actividades radican en una única entidad. La actividad inhibidora se corresponde con la proteína inicialmente descrita por Walsh y col (150), que como ya se ha mencionado no tiene efecto sobre PQG. De la misma forma, la proteína estimuladora de PQG no tiene efecto sobre PQA (234).

Es frecuente en la bibliografía designar como modulador/ a la actividad estimuladora de PQG e inhibidor a la proteína originalmente descrita por Walsh y col (150).

La proporción de ambas actividades, inhibidora y estimuladora, varía en los diversos tejidos de mamíferos, así, mientras el músculo esquelético contiene casi exclusivamente la primera, - el intestino delgado contiene casi exclusivamente la segunda. -- Muchos otros tejidos contienen cantidades comparables de ambas - actividades. La distribución del modulador corre paralela a la -- distribución de la PQG y la del inhibidor a la de PQA (210).

Se ha purificado a homogeneidad el modulador de corazón de perro (235) con un peso molecular mínimo de 34.000 D, muy asimétrico, de punto isoeléctrico 4.0 y con alto contenido de aminoácidos ácidos. Este modulador exhibe múltiples bandas en -- electroforesis en gel de poliacrilamida debido a que puede exis--

tir en forma de agregados moleculares activos a base de una sub-unidad común.

El modulador disminuye la actividad basal en ausencia / de cGMP e incrementa la actividad total en presencia del mismo, - con lo que se aumenta la dependencia de la enzima respecto del nucleotido cíclico. Recientemente (235 y 236), se ha descrito que es te efecto del modulador se produce sólo en la fosforilación/ de histonas, teniendo muy poca incidencia cuando se utilizan otros sustratos como protamina, glucógeno sintetasa, troponina, fosfori-lasa quinasa o triglicérido lipasa sensible a hormonas. El meca--nismo de actuación del modulador, en contraste con el inhibidor - de PQA que se une a la enzima, es a través de la interacción con/ las histonas, básicas, para dar un sustrato más efectivo (235)

Aunque se ha descrito que el modulador se requiere para la actividad PQG (190,193,196,234 y 235), recientes estudios con/ PQG purificada de corazón y pulmón muestran actividad en ausencia del modulador (160,199 y 200). Estas discrepancias se deben en -- gran parte a las condiciones de ensayo empleadas, concretamente a la concentración de catión divalente y tipo y concentración de -- sustratos.

En estudios en los que se utilizan muy altas concentra- ciones de Mg^{2+} (50 - 100 mM) no existe requerimiento de modula-- dor (160,161,192 y 193). Se ha demostrado que la concentración - óptima de Mg^{2+} para pulmón de cobaya en ausencia de modulador - es de 100 mM comparado con 20mM en su presencia con una incorpo -

ración en el sustrato cinco veces mayor en este último caso. Además a 100 mM de Mg^{2+} la PQG se estimula solamente dos veces por cGMP y esta estimulación es independiente del modulador mientras que a 10 mM de Mg^{2+} la enzima se estimula más de once veces por el nucleótido cíclico dependiendo además de la presencia del modulador (237). Estos datos experimentales indican que el modulador se requiere no sólo para la máxima actividad de PQG sino - también para la máxima estimulación de la enzima por cGMP cuando se ensaya a concentraciones de Mg^{2+} más fisiológicas (10 mM).

La fosforilación de histonas ricas en arginina (H3) con concentraciones no saturantes de ATP exhibe una absoluta dependencia del inhibidor (216 y 217) mientras que la de la fracción total de histonas, H1 o H2B, con concentraciones saturantes de ATP, muestra una pequeña o nula dependencia del modulador (160, 192, 199/ y 200).

Se ha demostrado que los efectos del modulador son independientes de la concentración de ATP (212) y en cuanto al tipo - de sustrato empleado se ha demostrado que la fosforilación de las distintas fracciones de histonas varía en su grado de dependencia del modulador (236 y 238), resultando ésta muy acentuada para la histona rica en arginina (H3) pero sólo muy ligera para la fosforilación de la histona H2B.

Recientemente se ha descrito que la interacción de PQG/ con las histonas produce un aumento en la actividad basal (ensaya da sin cGMP) y una disminución de la actividad total (ensayada -- con cGMP) así como la disminución de la unión del cGMP a la enzima, dependiendo este efecto del tiempo, temperatura y concentra--

ción (236). La histona H3 induce una pérdida de la actividad mucho máyor que la H2B mientras que otros sustratos "in vitro" para PQG, como troponina, fosforilasa quinasa o triglicérido lipasa - sensible a hormonas no afectan a la actividad de la enzima. El papel relevante de los restos de arginina se ha puesto de manifiesto tratando las histonas con 2,3 -butanodiona, lo que conlleva la anulación del efecto que se ha comprobado que puede ser también - inducido por la poli-L-arginina.

El modulador neutraliza la acción de histonas y poli-L-arginina sobre PQG y esta puede ser una de las razones de que los investigadores que emplean histona H3 como sustrato encuentren requerimiento de modulador para la actividad y dependencia de cGMP/ de la enzima. Los inhibidores de tripsina obtenidos de soja y habas tienen un efecto similar al modulador demostrándose que actúan interaccionando con histona y poli-L-arginina y no por inhibición de actividad proteolítica (236). La unión del cGMP a PQG también/ protege a la enzima de los cambios inducidos por histona y poli-L-arginina.

El modulador, al igual que el inhibidor, no es sólo un/ constituyente natural de las células, sino que juega ciertos papeles biológicos a juzgar por las alteraciones en sus niveles que - se han detectado en ciertas situaciones fisiológicas y patológicas. Así, los niveles de modulador e inhibidor disminuyen en tejido adiposo y se incrementan en páncreas en diabetes provocada por aloxana en ratas (164) y el nivel del modulador respecto al del - inhibidor es más alto en hepatoma 3924 A que en hígado (239).

Recientemente se ha descrito que cafeína, etanol y feno

Barbital disminuyen las actividades estimuladora e inhibidora de/ proteína quinasas en hígado (240) y cerebelo (241) de ratones a los que se ha administrado dosis elevadas de estas drogas durante un tiempo prolongado.

1.4.9. Homología entre PQG y PQA

Se ha propuesto que PQG y PQA son proteínas homólogas - (56,57 y 242) sobre la base de una serie de similitudes existentes entre ambas como son su tamaño, asimetría molecular, afinidad hacia el nucleótido cíclico y el ATP, requerimiento de cationes - divalentes, especificidad de sustratos "in vitro" y capacidad de autofosforilación. El sitio autofosforilable está implicado en la inhibición de la subunidad catalítica, C, por parte de la reguladora, R, en PQA y en la inhibición del dominio catalítico por el regulador en la PQG. La capacidad de PQG y PQA de catalizar la fosforilación una de la otra y la posibilidad de conseguir "in vitro"/ enzimas "híbridas" sugiere una gran analogía entre los dominios - reguladores de las dos enzimas. Además la composición de aminoácidos de PQG y PQA (tipo II) exhibe un 70-90% de homología.

Los modelos moleculares propuestos para ambas enzimas - dan cuenta de todas estas analogías y sugieren una evolución paralela a partir de una molécula ancestral común. Son de destacar, - sin embargo, las importantes diferencias existentes en la interacción de cada enzima con las proteínas sustratos y moduladoras y en la respuesta antigénica tanto de la porción reguladora como de la catalítica. La peculiaridad más notable a nivel estructural radica en la conexión de los dominios regulador y catalítico por un enlace peptídico en la PQG. Según las teorías clásicas de la evolución de proteínas se puede diseñar un mecanismo de emergencia -

para las proteína quinasas dependientes de nucleotidos cíclicos/
a partir de una molécula ancestral común (FIG. 10) (242).

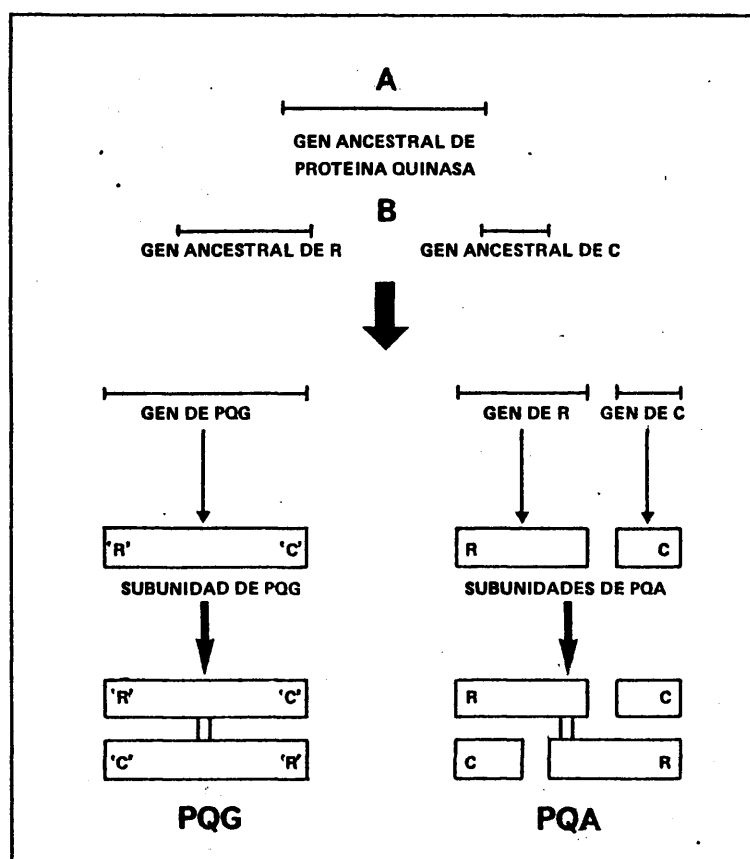


FIG.10.- Posibles esquemas evolutivos para las proteína quinasas dependientes de cAMP (PQA) y de cGMP (PQG). R y C son las subunidades reguladora y catalítica de PQA y 'R' y 'C' son los dominios regulador y catalítico de PQG (242).

En el esquema A, la proteína quinasa ancestral es estructuralmente similar a PQG, compuesta por un único tipo de subunidad la cual habría evolucionado a dominios reguladores y catalíticos separados por escisión génica.

En el esquema B, la proteína quinasa ancestral similar/ a PQA, está compuesta por dos subunidades separadas y la evolución habría tenido lugar por fusión génica.

La distribución en el reino animal (con la PQG particularmente abundante en artrópodos) y la mayor eficacia y versatilidad de PQA en cuanto a fosforilación de sustratos sugieren una ventaja evolutiva para esta última enzima (esquema A) aunque a priori, no puede descartarse cualquier otro esquema evolutivo.

También es posible, en principio, que las subunidades - de PQA hayan surgido a través de una modificación post-traslacional (por ejemplo, proteólisis) de una única cadena polipeptídica que contuviera los dominios regulador (R) y catalítico (C). Aunque hay precedentes del papel de la proteólisis en la formación/ de proteínas biológicamente activas, no se ha demostrado la existencia de ninguna PQA con actividad reguladora y catalítica asociada a una sola cadena polipeptídica y es muy probable que las/ subunidades R y C estén codificadas en genes separados como se - muestra en la FIG 10 (242).

La composición de aminoácidos del estimulador de PQG -- extraído de corazón bovino, es muy similar (alrededor del 90% de homología) al modulador de langosta que posee actividad estimuladora de PQG e inhibidora de PQA en una única entidad. Estos resultados sugieren que así como PQG y PQA, ambos tipos de moduladores son proteínas homólogas con un origen ancestral común -- (esquema A) (239).

1.5. Proteína quinasas independientes de mensajero (PQI)

Las proteína quinasa denominadas independientes de mensajero, dependientes de ATPo simplemente independientes (PQI), - constituyen un grupo de enzimas para las que no se conocen agentes reguladores que actúen directamente sobre ellas aunque se ha determinado la incidencia de ciertos efectores en los procesos de fosforilación en que se encuentran implicadas algunas de estas enzimas. Así, por ejemplo, la inhibición de la iniciación de la síntesis de proteínas en deficiencia de hemo, se debe a la activación de un inhibidor regulado por hemo (HRI), que es una proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos que inactiva el factor de iniciación eIF_2 fosforilando específicamente su subunidad . El mecanismo por el cual el hemo regula reversiblemente esta proteína quinasa no se conoce todavía (para revisión del tema y obtención de referencias originales ver 20-22).

1.5.1. Características diferenciales de las proteína quinasas independientes.

Un aspecto importante acerca de las proteína quinasas independientes es determinar si tienen entidad propia o si se trata de las subunidades catalíticas aisladas, C, del sistema proteína/quinasa dependiente de cAMP. En este sentido sólo la subunidad C/ se inhibe por acción de la proteína originalmente descrita por Walsh y col. (150) y no por la subunidad reguladora R.

Las proteína quinasas independientes pueden ser diferenciadas de las que dependen de nucleótidos cíclicos, además de por su grado de estimulación en presencia de éstos, por la preferen-

cia de sustratos ácidos de aquellas y su capacidad de utilizar -
GTP como donador de fosforilo así como por otros efectores como -
sales y diamida (162).

Las proteína quinasas independientes se denominan gene-
ralmente de acuerdo con el sustrato sobre el que actúan recibien-
do el nombre de caseína quinasas, fosvitina quinasas o fosfopro--
teína quinasas, teniendo en cuenta que los sustratos que fosfori-
lan son proteínas ácidas que generalmente contienen multitud de -
restos fosfoamino (8).

Se han descrito, sin embargo, proteína quinasas indepen-
dientes en las que no se dan algunas de las características ante-
riormente mencionadas. Así, por ejemplo, existen enzimas de este/
tipo con una marcada preferencia por histonas (242) o protamina -
(243) o que no diferencian entre sustratos ácidos y básicos (244).
También se han descrito proteína quinasas independientes incapa--
ces de utilizar el GTP como donador de fosforilo (245 y 246), -
aunque normalmente este nucleótido actúe como tal para este tipo/
de enzimas (247-250). Normalmente el GTP es peor donador que el -
ATP. Las enzimas para las que ambos nucleótidos son igualmente -
eficaces se denominan quinasas tipo ATP-GTP (251) o simplemente -
tipo G. Recientemente se ha descrito una proteína quinasa especí-
fica de GTP en membrana plasmática de fibroblastos de ratón (252).

Un factor a tener en cuenta en lo referente a la utili-
zación de GTP como donador de fosforilo es la formación de (β, γ
 ^{32}P) ATP por intercambio isotópico con (γ ^{32}P) GTP en preparacio-
nes crudas de proteína quinasa (253).

Diversos autores (71 y 254) describen el efecto opuesto

del KCl, activador sobre las caseína quinasas e inhibidor sobre las proteína quinasas dependientes de cAMP. La estimulación por KCl se observa con otros sustratos distintos de la caseína lo que indica que se trata de un efecto general para este tipo de enzimas (71). Kumar y col (255) han demostrado que el KCl evita la inhibición por el sustrato y Kemp y col (254) han observado un efecto directo del KCl sobre la sedimentación de la enzima.

No obstante, se han descrito proteína quinasas independientes cuya actividad es insensible al aumento de concentración/salina (242), otras que se inhiben a bajas concentraciones de KCl o NaF (245 y 256) y otras cuya actividad aumenta a concentraciones salinas intermedias (0.1-0.15 M de KCl) pero que se inhiben a altas concentraciones (0.5 M de KCl) (249).

1.5.2. Estructura

El peso molecular calculado para varias PQI de diversa procedencia oscila entre 30.000 y 160.000 (242,243,245-249 y 256) aunque cuando el cálculo se hace en electroforesis con SDS, algunas de alto peso molecular aparecen con tamaños considerablemente menores, indicando la existencia de agregados enzimáticos (248).

A partir de reticulocitos de conejo se han aislado dos proteína quinasas independientes denominadas CKI (que utiliza preferentemente ATP) y CKII (que utiliza GTP y ATP con la misma eficacia) (250). CKI de peso molecular 37.000 D es un monómero y CKII de 130.000 D consta de tres tipos de subunidades distintas:

α (42.000) α' (38.000) y β (24.000) en relación 1:1:2 (α, α, β_2). Una estructura similar a CKII ha sido descrita para la caseína --

quinasas purificadas de células de tumor ascítico. Novikoff (257) e hígado de rata (258).

1.5.3. Autofosforilación

Tanto CKI como CKII se autofosforilan incorporándose en esta última 1 mol de fosfato por subunidad β . Otros autores han encontrado también autofosforilación en la subunidad más pequeña/ (24.000) (257), lo que indica que puede ser un mecanismo general de control para este tipo de enzimas.

1.5.4. Especificidad de sustrato

Estudios realizados con caseína quinasa de glándula mamaria (259) y de hígado de rata (260 y 261) indican que como determinante de especificidad en el sustrato se requiere la presencia en el segundo resto situado al lado C terminal de la posición fosforilada (serina o treonina), de un aminoácido ácido, resultando el aspártico más eficaz que el glutámico (261).

La presencia de un resto básico adyacente al ácido, disminuye considerablemente la afinidad por el sustrato. Sin embargo, este requerimiento en la secuencia del sitio de fosforilación no es suficiente y parece jugar un papel importante su conformación. En este sentido es de destacar el estrecho paralelismo existente entre los sitios fosforilados y la configuración β que también es preferida por las proteínas quinasas dependientes de cAMP (128), por lo que se ha postulado que tal conformación puede representar una condición general para que tenga lugar la fosforilación de proteínas (261).

Se ha aislado de fracción nuclear y carcinosarcoma de Walker 256 un tipo de PQI que cataliza la formación en histonas de un enlace ácido-lábil (^{32}P) - 3 - fosfohistidina (262).

1.5.5. Regulación

Se ha encontrado en varios tejidos bovinos y aislado y caracterizado de corteza adrenal un inhibidor macromolecular estable al calor, que inhibe específicamente las proteína quinasas independientes tipo G aisladas del mismo tejido (263). Después de purificado hasta homogeneidad este inhibidor se obtiene como un agregado con un peso molecular mínimo en SDS de 16.500 D.

Recientemente, se ha descrito que una caseína quinasa de hígado de rata se estimula por policationes, particularmente por polipéptidos básicos tales como poli-L-lisina, histona y protamina (264), que no sirven como sustrato pero que al interactuar con éste, facilitan su fosforilación. También se ha descrito la estimulación de la fosforilación de fosfoproteínas nucleares por la adición de policationes (265 y 266) y que la fosforilación de fosvitina por quinasa de hígado de gallo se estimula por espermina y espermidina (267).

1.5.6. Funcionalidad de las proteína quinasas independientes

Las fosfoproteína quinasas se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos animales y parecen jugar un importante papel en la regulación celular (5). Se han encontrado entre otros tejidos en hígado de rata (245 y 257) y de gallo (248), cerebro bovino (268), linfocitos humanos (242), reticulocitos (247 y 250)

y eritrocitos (255) de conejo, músculo esquelético de cazón (243) y además de en fracción soluble asociada a diversas fracciones - subcelulares como microsomas de corteza cerebral de cobaya (12), ribosomas de reticulocitos de conejo (247) y membranas de eritrocitos humanos (249). Se ha encontrado en el núcleo una gran variedad de actividades de proteína quinasa (262 y 269). La mayoría de estas enzimas fosforilan proteínas nucleares independientemente de nucleótidos cíclicos, desconociéndose su relación con las proteínas quinasas del citosol.

Esta amplia distribución hace difícil determinar si las fosfoproteína quinasas tienen una única función en el metabolismo general o si sus funciones son múltiples dependiendo de la compartimentalización celular.

También se ha encontrado este tipo de enzimas en eucariontes sencillos como el hongo *Neurospora crassa* (246) y levadura (15) y son muy frecuentes en una gran variedad de virus donde catalizan la fosforilación de polipéptidos virales específicos - (para revisión ver referencia 270). Existen evidencias de que en virus -RNA la fosforilación de proteínas virales por proteína quinasa del virus tiene importantes consecuencias biológicas - (271) y recientemente se ha descrito que el producto del gen transformante del virus de sarcoma de ave es una proteína quinasa independiente de cAMP (272).

1.6. Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}

El requerimiento de Ca^{2+} por parte de la fosforilasa --quinasa se determinó por vez primera en 1.964 (273) y su designación como proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} data del conocimiento de su potencial multifuncionalidad ya que aunque la glucógeno fosforilasa b es el único sustrato bien definido fisiológicamente para la enzima, ésta también fosforila "in vitro" caseína, troponina I y glucógeno sintetasa. Péptidos sintéticos han resultado ser sustratos mucho peores que la fosforilasa b lo que sugiere que la conformación del sitio fosforilado es un importante determinante para la especificidad de esta enzima que puede además autofosforilarse.

Recientemente se ha descrito (274 y 275) que la quinasa de la cadena ligera de la miosina, una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} con diferente especificidad (276) adquiere la dependencia del catión en virtud de la interacción con el modulador dependiente de Ca^{2+} (CDR) de la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico.

Waisman y col (277) han demostrado que la quinasa de la cadena ligera de la miosina es una enzima multifuncional que cataliza también la fosforilación de fosforilasa quinasa e histonas y se conoce como proteína quinasa dependiente de modulador. El descubrimiento por Cohen (278) de que preparaciones de fosforilasa quinasa contienen una proteína de bajo peso molecular similar, si no idéntica, a la proteína reguladora dependiente de Ca^{2+} (CDR),/ permite aplicar esta misma designación a la fosforilasa quinasa./ Es probable que sean descritas otras proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} a través del modulador. Así, por ejemplo, Schulman y

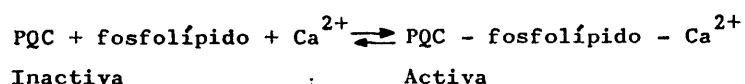
Greengard (279) han observado una autofosforilación dependiente - de Ca^{2+} . CDR en membranas obtenidas de diversos tejidos incluyendo pulmón, bazo, músculo esquelético, vaso deferente, corazón y - glándula adrenal. Recientemente se ha descrito la existencia en - microsomas de adipocitos de rata, de una actividad proteína quina - sa activada por calmodulina distinta de la fosforilasa quinasa o/ de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (280).

1.7. Proteína quinasas dependientes de fosfolípidos y activadas por Ca^{2+}

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de actividad quinásica multifuncional denominado proteína quinasa dependiente/ de fosfolípidos y activada por Ca^{2+} (281) o proteína quinasa C - (PQC), que está regulada por este catión divalente pero no por nu - cleótidos cíclicos (para revisión y primeras referencias ver [223])

La activación por bajas concentraciones de Ca^{2+} se da - en presencia de un factor asociado a membranas que se ha identifi - cado como fosfolípidos. Fosfatidilserinas (PS) y en menor propor - ción fosfatidilinositoles (PI) y fosfatidiletanolaminas (PE) son/ activos en este papel mientras que fosfatidilcolinas y esfingomie - linas prácticamente no ejercen ningún efecto.

La estequiometría del proceso de activación, que se pue - de expresar según la siguiente ecuación:



se desconoce. De los cationes divalentes probados sólo el Sr^{2+} es capaz de sustituir al Ca^{2+} pero con muy baja eficacia. El proceso es reversible y la enzima puede ser inactivada secuestrando el Ca^{2+} del complejo activo con EGTA.

Aunque el mecanismo de activación de PQC es análogo al/ de las proteína quinasas dependientes de modulador anteriormente/ mencionadas, ambos tipos de enzimas difieren en sus propiedades físicas y cinéticas y además la CDR no puede reemplazar a los fosfolípidos en la activación de PQC.

Una pequeña cantidad de diacilglicerol (DG) insaturado/ disminuye considerablemente las concentraciones de Ca^{2+} y fosfolípidos necesarios para la activación de la enzima (282) y es posible que el DG insaturado, que deriva del recambio de PI provocado por variaciones de estimuladores extracelulares, actúe como mensajero para activar la enzima y que el Ca^{2+} y fosfolípidos como PS/ o PI jueguen un papel cooperativo en este mecanismo receptor único (282 y 283).

La proteína quinasa C (peso molecular 77.000 D) se ha/ encontrado en muchos tejidos de mamíferos tales como cerebro, hígado, riñón, pulmón, corazón, músculo esquelético, glóbulos rojos y tejido adiposo. En cuanto a su distribución subcelular se localiza tanto en fracción soluble como particulada. Teniendo en cuenta su requerimiento de fosfolípidos, probablemente juegue un papel en la regulación de los fenómenos asociados con membranas en/ respuesta al movimiento del Ca^{2+} . Glucógeno sintetasa y fosforilasa quinasa son fosforiladas y reguladas por PQC.

Al igual que PQA y PQG esta enzima puede ser activada -
proteolíticamente, además de por tripsina, por una proteasa depen-
diente de Ca^{2+} que es incapaz de actuar sobre las dos primeras. -
La enzima así activada no requiere Ca^{2+} ni fosfolípidos.

1.8. Proteínas quinasas dependientes de RNA de doble banda indu- cidas por el interferon.

Los interferones son glicoproteínas antivirales, que -
como las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento son -
fisiológicamente activos a bajas concentraciones en virtud de la
existencia de receptores específicos situados en la superficie -
celular. Su formación se induce en varias células animales des-
pués de la infección por una gran variedad de virus y una vez li-
berado de las células productoras interacciona con otras células
blanco, transformándolas a un estado antiviral en el que está im-
pedida la replicación de un gran número de virus.

Los RNAs de doble banda, tanto naturales como sintéti-
cos, son los más potentes inductores de interferón. Además el -
RNA de doble banda es también un potente inhibidor de la síntesis
de proteínas en extractos de células tratadas con interferón. Es-
ta inhibición es debida a los elevados niveles de una proteína --
quinasa y de una oligonucleotido polimerasa que requieren RNA de/
doble banda, ATP y Mg^{2+} (284).

La oligonucleotido polimerasa, denominada 2',5'-oligo -
(A) polimerasa, sintetiza a partir del ATP, oligonucleotido conte-
niendo el enlace fosfodiéster 2',5'. El 2',5'-oligo (A) no es por
si mismo inhibidor de la síntesis de proteínas, sino que activa -
una endonucleasa presente en células tratadas o no con interferón
de tal forma que la inhibición de la síntesis de proteínas ocurre

por degradación del mRNA. La activación de la proteína quinasa - por RNA de doble banda conduce a la fosforilación de un polipéptido de peso molecular 67.000 y de la subunidad del factor de - iniciación eIF₂ (285) ésta última en los mismos sitios que fosforila el inhibidor regulado por hemo, HRI, (ver apartado 1.5.), lo que sugiere que el mecanismo de inhibición de la síntesis de proteínas es análogo en ambos casos (286).

La proteína quinasa dependiente de RNA de doble banda - tiene una potencial multifuncionalidad ya que fosforila diversas fracciones de histonas (287 y 288). La enzima, que se encuentra - en los lavados salinos de ribosomas con alta concentración de KCl (289), ha sido purificada parcialmente (286-288). Recientemente - se ha purificado y caracterizado un precursor de la enzima en lisados de reticulocitos (290).

Se conoce relativamente poco acerca de los requerimientos del RNA de doble banda para la activación de la proteína quinasa. Utilizando proteína quinasa dependiente de RNA de doble banda parcialmente purificada de células de tumor ascítico de Ehrlich tratadas con interferón, resulta que poli (I). poli (C) puede sustituir al RNA de doble banda del reovirus pero poli(I), poli (C)/poli(di). poli (C) y poli (I). poli (dc) no (287). También se ha demostrado con extractos de células HeLa tratados con interferón/ que se requiere una cadena relativamente larga de pares de bases, que no esté interrumpida por una discontinuidad en algunas de las cadenas complementarias o por errores en el apareamiento (291)./ Curiosamente estas características estructurales son las descritas en la bibliografía para la inducción del interferón.

1.0. Sistema nucleótidos cíclicos-proteína quinasas en insectos.

Se ha comprobado que el cAMP está implicado en el control hormonal de la metamorfosis y diapausia de insectos así como en otras importantes funciones fisiológicas como la ovulación, neurotransmisión, esclerotización de la cutícula, formación del pupario etc. (292-296). Aunque no se dispone de mucha información acerca del papel del cGMP en estos organismos, este nucleótido cíclico parece implicado en la neurotransmisión (296) e interrupción de la diapausia (297). Ishikawa y col (205) han encontrado en el grillo Acheta domesticus (Orthoptera: Gryllidae) un contenido en cGMP de 2-3 veces superior al de cAMP en contraposición con unos niveles de cAMP 20-40 veces superiores a los de cGMP en diversos tejidos de mamíferos. Los elevados niveles de cGMP en este insecto han sido confirmados por otros investigadores (298) y unas proporciones similares se han encontrado en cuerpo graso de la polilla Hyalophora cecropia (Lepidoptera: Saturniidae) (207) y el sistema nervioso de Manduca sexta (Lepidoptera: Sphingidae) (296), lo que ha sugerido un papel relevante del cGMP en insectos.

Kuo y col (189) fueron los primeros en describir la existencia de proteína quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos/ en cinco especies de insectos; las polillas Hyalophora cecropia y Antheraea polyphemus (Lepidoptera: Saturniidae); la cucaracha -- Blaberus discoidalis (Orthoptera: Blattidae) y Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). Salvo con esta última, la gran divergadura de las especies escogidas ha permitido el estudio del sistema proteína quinasa en distintos órganos y tejidos. También se ha aislado a partir de huevos de Drosophila melanogaster una proteína receptora de cAMP no relacionada con el sistema proteína -- quinasa ni con la fosfodiesterasa de cAMP cuya función fisiológica se desconoce (44).

Dentro de los diferentes órdenes de insectos estudiados en lepidópteros predomina la proteína quinasa dependiente de cGMP hasta el punto de que en larva de gusano de seda, Bombyx mori y - en cuerpo graso de la polilla cecropia y del gusano del tabaco - tan solo se detecta esta actividad quinásica (189 y 206). Una excepción la constituye el sistema nervioso central de Manduca sexta en donde la actividad quinásica detectada es dependiente de - cAMP (299). En ortópteros y dípteros sin embargo, la proteína quinasa dependiente de cAMP es relativamente más abundante (189 y -- 300).

Parece existir en insectos una correlación entre proteína quinasa dependiente de cAMP y tejido muscular, así, los componentes anatómicos de cecropia con una mayor proporción de PQA respecto de PQG son la cubierta de larva y el tórax de adulto, ambos con un importante contenido muscular y los niveles más elevados de PQA en diferentes insectos estudiados se encuentran en el músculo de la cucaracha Blaberus discoidalis (189).

Las proteínas quinasas de insectos mejor estudiadas son/ las del gusano de seda, Bombyx mori, (Lepidoptera: Bombycidae),/ habiéndose aislado y caracterizado parcialmente las enzimas componentes del sistema en huevo (301 y 302) y pupa (161 y 303) y determinado su proporción relativa a lo largo del desarrollo embrionario y postembrionario (206). Se ha descrito que contrariamente/ a las enzimas de otras procedencias, la PQG de Bombyx mori tiene/ un absoluto requerimiento de compuestos con grupos sulfhidrilo para su activación por cGMP (161), aunque recientemente se han señalado algunas discrepancias a este respecto (304). Inoue y col. -- (204) mediante proteólisis limitada de esta enzima han obtenido - una importante información acerca de la estructura y mecanismo de

activación de las proteína quinasas dependientes de cGMP.

Otras proteína quinasas han sido obtenidas de cuerpo - graso de cucaracha Periplaneta americana (Orthoptera: Blattidae)/ (300) y Locusta migratoria (Orthoptera: Locustidae) (305) y de - huevos de Drosophila melanogaster (49). Se ha descrito también la existencia de proteína quinasas dependientes de cAMP y cGMP en el sistema nervioso central de la polilla de la cera Galleria mello-nella (Lepidóptera : Pyralididae) y se ha sugerido la existencia/ en el mismo de una proteína quinasa dependiente de cIMP (34). Co-mo anteriormente se ha mencionado, en sistema nervioso central de Manduca sexta se ha detectado actividad quinásica dependiente de/ cAMP, tanto en fracción soluble como en particulada, que presenta algunas características peculiares como son el requerimiento de - compuestos con grupos sulfhidrilo para su máxima actividad y el - hecho de que el cAMP disminuya la Km para el ATP, fenómeno aparen- temente específico de tejido nervioso de mamíferos y que no se ha detectado para otras proteína quinasas de insectos (300-304). Ade- más esta proteína es insensible al inhibidor originalmente descri- to por Walsh y col (150) mientras que su actividad se ve afectada considerablemente por la presencia de un inhibidor endógeno (299) A partir de cubierta de larva de polilla cecropia se ha obtenido/ un preparado bruto de proteína moduladora con capacidad de inhibir PQA y estimular PQG (232).

La variación de las actividades de proteína quinasas de- pendientes de nucleótidos cíclicos durante el desarrollo de Bombyx mori, que llega a la desaparición de la proteína quinasa dependien- te de cAMP en el estado de larva, sugiere que ambas enzimas se en- cuentran bajo el control hormonal implicado en la metamorfosis -

(206) a lo largo de la cual tienen lugar importantes cambios metabólicos.

La metamorfosis del díptero Ceratitis capitata (Díptera: Trypetidae), material biológico utilizado en los estudios que aquí se van a exponer, responde a un modelo de desarrollo holometábolo. Del huevo salen larvas móviles con capacidad de alimentarse, que no tienen parecido morfológico alguno con el insecto/adulto. Después de un periodo de crecimiento jalonado por una serie de mudas, la larva entra en un estado semilaciente denominado adulto farato, de intenso metabolismo en el que se producen simultáneamente histólisis y regeneraciones de tejidos que suponen una reorganización estructural completa, para adquirir las características del estado adulto.

La acción coordinada del sistema neuroendocrino controla este complejo proceso. Las mudas, que ocurren durante el periodo larvario y la metamorfosis dependen de la secreción de la ecdisona u hormona de la muda (MH) por la glándula ecdisial, que a su vez está controlada por la hormona cerebral o protoracicotrópica (BH). El carácter de la muda está determinado por la hormona juvenil (JH) secretada por los corpórea allata. En presencia de MH y JH la muda mantiene las características de larva pero la actuación exclusiva de MH implica la diferenciación de los tejidos hacia las características del adulto.

Se ha comprobado que la producción de cAMP está directamente relacionada con la actividad de la glándula ecdisial en el lepidóptero Manduca sexta (306). La acentuada variación de los niveles de cAMP durante la metamorfosis de Drosophila melanogas-

ter (307) y el efecto ejercido por la toxina del cólera y los -
inhibidores de fosfodiesterasa cafeína y aminofilina sobre la me-
tamorfosis de Sarcophaga crasipalpis (292) sugieren que el cAMP/
tiene un importante papel en el proceso.

Dentro de la línea de investigación seguida en nuestro/
Departamento se ha estudiado la variación a lo largo del desarro-
llo del díptero Ceratitis capitata de los niveles de cAMP y cGMP
(308 y 309) y de las enzimas implicadas en su metabolismo (310--
312) y en la fosforilación-defosforilación de proteínas (313 y -
314), estableciendo su relación con la regulación hormonal post-
embrionaria y confirmando la conexión de los nucleótidos cícli--
cos y sus enzimas asociadas con la metamorfosis de insectos.

La actividad de proteína quinasa exhibe tres máximos a/
lo largo del desarrollo de Ceratitis capitata. El primero, de ma-
yor intensidad, viene a coincidir con la apolisis larva-pupa, el
segundo se encuentra hacia la mitad del estado de adulto farato
y el tercero en el adulto recién emergido. El perfil de activi--
dad quinásica es prácticamente coincidente con la actividad li--
gante de cAMP (313).

2.1. Material biológico

El díptero Ceratitis capitata (Wiedemann), utilizado en la experimentación, se cultiva en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (El Encín, Alcalá de Henares, Madrid) controlando cuidadosamente la dieta y las condiciones ambientales de temperatura y humedad como previamente se ha descrito (315). Los insectos se congelan a -70°C hasta su utilización en el caso de que ésta no sea inmediata.

Para la obtención de las cabezas del insecto adulto se utiliza una modificación del método puesto a punto previamente -- (316). Se introducen los insectos adultos congelados en un recipiente que contiene pequeños fragmentos cúbicos de goma (0.5 cm de arista aproximadamente) y se sumerge en aire líquido durante 5 min. Se agita enérgicamente durante 30 s y se vuelve a congelar otros 5 min. Después se vierte su contenido sobre un sistema de tamices de malla decreciente con lo que se consigue la separación de los distintos componentes anatómicos del insecto; cabezas, el conjunto de tórax-abdomenes, alas y patas. Estas operaciones se realizan en cámara fría ($4-6^{\circ}\text{C}$).

2.2. Medida de las actividades enzimáticas

2.2.1. Ensayo de actividad de proteína quinasa

Se determina la radiactividad incorporada en una proteína sustrato, como resultado de la catálisis enzimática, utilizando (γ - 32 P) ATP.

El medio de incubación contiene tampón B (fosfato potásico 10mM a pH 7, con 2-mercaptoetanol 7mM), (γ - 32 P)ATP 5 μ M -- (2 - 3 x 10⁵ cpm), cAMP o cGMP 1 μ M, histona (fracción total), u ocasionalmente protamina, a una concentración de 1mg/ml y acetato magnésico 10 o 100 mM en función de la actividad quinásica que se pretenda detectar, dependiente de cAMP o cGMP, respectivamente.

La reacción se inicia con la adición del preparado enzimático alcanzándose un volumen final de 200 μ l. En los ensayos de eluidos de columnas cromatográficas se añaden 100 μ l de cada fracción. La incubación se lleva a cabo durante 5 min a 37° C con agitación constante. La detención de la reacción se consigue añadiendo 0.5 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 25% en baño de hielo. Cuando se utiliza como sustrato la protamina se añaden además 100 μ l de albúmina de una concentración de 10 mg/ml como agente coprecipitante. Una vez detenida la reacción se introducen los tubos en baño de hielo. La suspensión se filtra a vacío/ a través de Whatman GF/C, de 2.5 cm de diámetro, humedecidos previamente con TCA al 18%, se lava el tubo de ensayo con 3ml de TCA al 18% y a continuación el filtro con 6 ml del mismo para eliminar el ATP marcado residual. El filtro sobre el que está depositada la muestra, ligeramente húmedo, se introduce en un vial

con 3 ml de líquido de centelleo preparado con 4 g de PPO y 40 mg de POPOP disueltos en un litro de tolueno.

El conteo se efectúa en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3255, equipado con un sistema manual y automático de elección de ganancia y apertura de ventanas para la medida de emisiones beta. Las condiciones previamente seleccionadas para el isótopo ^{32}P son con ventana 20-1000 y ganancia 1.5%. El tiempo de conteo oscila entre 5 y 2 min dependiendo de la actividad de la muestra.

El grado de amortiguación ("quenching") de las muestras se determina por el método de estandar externo (ESR) gracias a un sistema automático que a tal fin posee el equipo contador.

El fondo del ensayo se determina mediante la desnaturalización previa del preparado enzimático por ebullición del mismo o por detención de la reacción a tiempo cero. Con una actividad total de 2×10^5 cpm de (γ - ^{32}P) en el ensayo, el valor medio del fondo son 300 cpm.

La desviación en los ensayos por triplicado no excede nunca de un 5% del valor medio.

2.2.2. Ensayo de actividad ligante de cAMP y cGMP

Se utilizan dos tipos de ensayos (A y B) para la medida de la actividad ligante de nucleótidos cíclicos.

El ensayo tipo A se basa en el método de Anderson y col. (317) y ha sido descrito con detalle previamente (313). Este mis-

mo ensayo se utiliza también para la medida de la actividad ligante de cGMP en presencia de este nucleótido cíclico tritiado.

El ensayo tipo B se basa en una modificación del método de Rosen y col (318). La incubación se lleva a cabo en tampón acético-acetato sódico 100 mM a pH 4.5 que contiene 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM junto con (8 - ^3H) cAMP o (8 - ^3H)-cGMP/ ($3-6 \times 10^4$ cpm). La reacción se inicia con la adición del preparado enzimático (hasta alcanzar un volumen final de 100 μl). En los ensayos de eluidos de columnas cromatográficas se añaden -- 25 μl de cada fracción. Transcurridos 45 min con la mezcla de reacción en baño de hielo, se efectúa la detención mediante la adición de 1 ml de solución saturada de sulfato amónico fría. La suspensión se filtra a vacío a través de Whatman GF/C previamente humedecido con solución saturada de sulfato amónico. Se lava cada tubo con 3 ml de la mencionada solución y la radiactividad/residual que queda en el filtro se elimina lavando con 6 ml de la solución saturada de sulfato amónico.

Una variante del ensayo es realizar la incubación en tampón B, con un volumen final de 150 μl y se denomina ensayo tipo B en tampón fosfato para diferenciarlo del ensayo en tampón acetato.

El filtro en el que se encuentra la muestra, se introduce en un vial con 3 ml de líquido de centelleo preparado con 150 g de naftaleno, 10.5 g de PPO, 0.45 g de POPOP y dioxano hasta 1500 ml.

El conteo se efectúa con el equipo contador utilizado para la medida de la actividad quínica, en las condiciones au-

tomáticas prefijadas $^3\text{H}/Q^3\text{H}$ durante un tiempo que oscila entre - 5-10 min.

2.2.3 Ensayo de actividad de fosfoproteína fosfatasa.

Tanto el procedimiento de obtención de la fosfohistona marcada con ^{32}P , basado en el método de Maeno y Greengard (319), como el ensayo de actividad de fosfoproteína fosfatasa basado en el método de Khandelwal y col (320) han sido descritos previamente (314).

2.3. Purificación de (γ - ^{32}P)ATP

Para la purificación de (γ - ^{32}P)ATP y la determinación/ de la extensión de la hidrólisis se sigue el método de Rodbell y Kryshna (321). El nucleótido marcado radiactivamente se aplica - en una columna de Dowex AG 1 x 4 (Cl^-) y se eluye sucesivamente/ con 10 ml de H_2O destilada, 10 ml de HCl 0.01 N, 10 ml de HCl -- 0.01 N, NaCl 0.02 N, 10 ml de HCl 0.01 N, NaCl 0.2 N y 3 ml de - HCl 0.25 N.

Se recoge en viales fracciones de 1 ml que se mezclan - con 15 ml de líquido de centelleo preparado con 150 g de naftale_no, 10.5 g de PPO , 0.45 g de POPOP , dioxano hasta 1500 ml y 300/ ml de agua destilada para posteriormente efectuar el conteo en/ las condiciones señaladas para la medida de la actividad quinási_{ca}.

2.4 Estudios preliminares de las actividades quinásicas y ligantes de nucleotidos cíclicos en distintas etapas del desarrollo

2.4.1. Extracción

El material biológico utilizado es larva de 6 días, - adulto farato de 5 días y cabezas de insecto adulto.

El adulto farato y la larva se homogeneizan en un homogeneizador Omni-Mixer Sorvall, al máximo de revoluciones, durante tres periodos de 2 minutos, con tampón fosfato potásico 10 mM a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM, EDTA 4mM y acetato magnésico 10 mM en una proporción de 2 ml de tampón por gramo de tejido. Las cabezas de insecto adulto se homogeneizan en tampón B en un homogeneizador Potter-Elvehjem, equipado con émbolo de teflón durante tres periodos de dos minutos. En esta etapa, al igual - que en las restantes, se mantiene una temperatura de 0-4° C.

Los homogeneizados obtenidos se centrifugan en una centrífuga Sorvall RC2-B (rotor SS-34) refrigerada entre 0-4° C, durante 15 minutos a 37.000 g obteniéndose después de filtrar por gasa el sobrenadante de centrifugación (SC).

2.4.2. Precipitación ácida

Siguiendo el método de Miyamoto y col (322) se lleva - el sobrenadante de centrifugación (SC) de larva y adulto farato/ hasta un pH de 4.9 con acético 0.1 N, manteniendo las muestras - en baño de hielo con agitación constante. El pH se determina mediante un pHmetro Radiometer 26 calibrado previamente con un pa

trón de Radiometer. Una vez alcanzado el pH mencionado se mantienen las condiciones durante 20 minutos transcurridos los cuales se centrifuga en Sorvall RC2-B (rotor SS-34) durante 15 minutos a 37.000 g y el sobrenadante se lleva a pH 7 con potasa diluida. Generalmente es necesario volver a centrifugar en las mismas condiciones el sobrenadante puesto que al retornar al pH original - suele aparecer una ligera turbidez. El preparado obtenido mediante esta experimentación se le denomina SH^+ .

La determinación del efecto de la precipitación ácida/ a distintos valores de pH sobre la actividad del sobrenadante de centrifugación se realiza sometiendo a tratamiento ácido, como - se ha indicado anteriormente, ocho fracciones de 13 ml de un preparado de este tipo obtenido a partir de adulto farato de 5 días. Mediante la adición de acético 0.1 N se alcanzaron las pH de -- 5.5, 5.2, 5.0, 4.8, 4.6, 4.4, 4.2 y 4.0. Los preparados SH^+ obtenidos se enrasan hasta 15 ml y se mide la actividad quinásica.

2.4.3. Precipitación con sulfato amónico

Los SH^+ de larva y adulto farato se llevan hasta el -- 70% de saturación de sulfato amónico mediante la adición de la - sal en polvo fino, lentamente (1 g/min aproximadamente) y con - agitación suave durante dos horas en baño de hielo. Se centrifuga a 37.000 g durante 15 minutos y el precipitado obtenido se - redisuelve en el mínimo volumen de tampón B.

2.4.4 Diálisis

Los preparados correspondientes al 70% de saturación -

del sulfato amónico se introducen en bolsas de diálisis Visking/Tubing 20/32, impermeables a sustancias de peso molecular superior a 45.000 D y se dializan frente a tampón B durante una noche en cámara fría (4-6° C).

2.4.5. Cromatografías de adsorción (Biogel HTP)

Los sobrenadantes obtenidos al centrifugar los preparados dializados de larva y adulto farato a 37.000 g durante 15 min, se aplican en columnas (1.5 x 17 cm) de hidroxapatito equilibradas con tampón B. La elución se efectúa primero con un gradiente lineal de 10-250 mM de fosfato potásico (200 ml de cada tampón a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM), recogiendo fracciones de 5 ml, y se concluye con tampón fosfato potásico 400 mM a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM.

Por otra parte, el sobrenadante de centrifugación, SC, obtenido de cabezas de insecto adulto se cromatografía directamente en una columna de hidroxapatito de idénticas dimensiones que las anteriores y equilibrada también con tampón B. Se eluye primero con un gradiente de 100-200 mM de fosfato potásico (45 ml de cada tampón conteniendo 7 mM de 2-mercaptoetanol) y después con tampón fosfato potásico 200 mM a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM. Se recogen fracciones de 5 ml.

Se ensaya la actividad quinásica y ligante de nucleotidos cíclicos de los eluidos de las tres cromatografías.

2.4.6. Concentración

Las fracciones correspondientes al máximo de actividad quinásica de los eluidos resultantes de cromatografiar en hidroxapatito los preparados de larva y adulto farato se introducen/ en bolsas de diálisis Visking Tubing 18/32 (impermeables a sustancias de peso molecular superior a 6.000D) y se dializan frente a una solución de polietilenglicol PEG 20.000 (Serva) al 15% (p/v) en tampón B durante una noche, con agitación constante en/ cámara fría (4-6°C).

2.4.7. Cromatografías de penetrabilidad (Sephadex G-200)

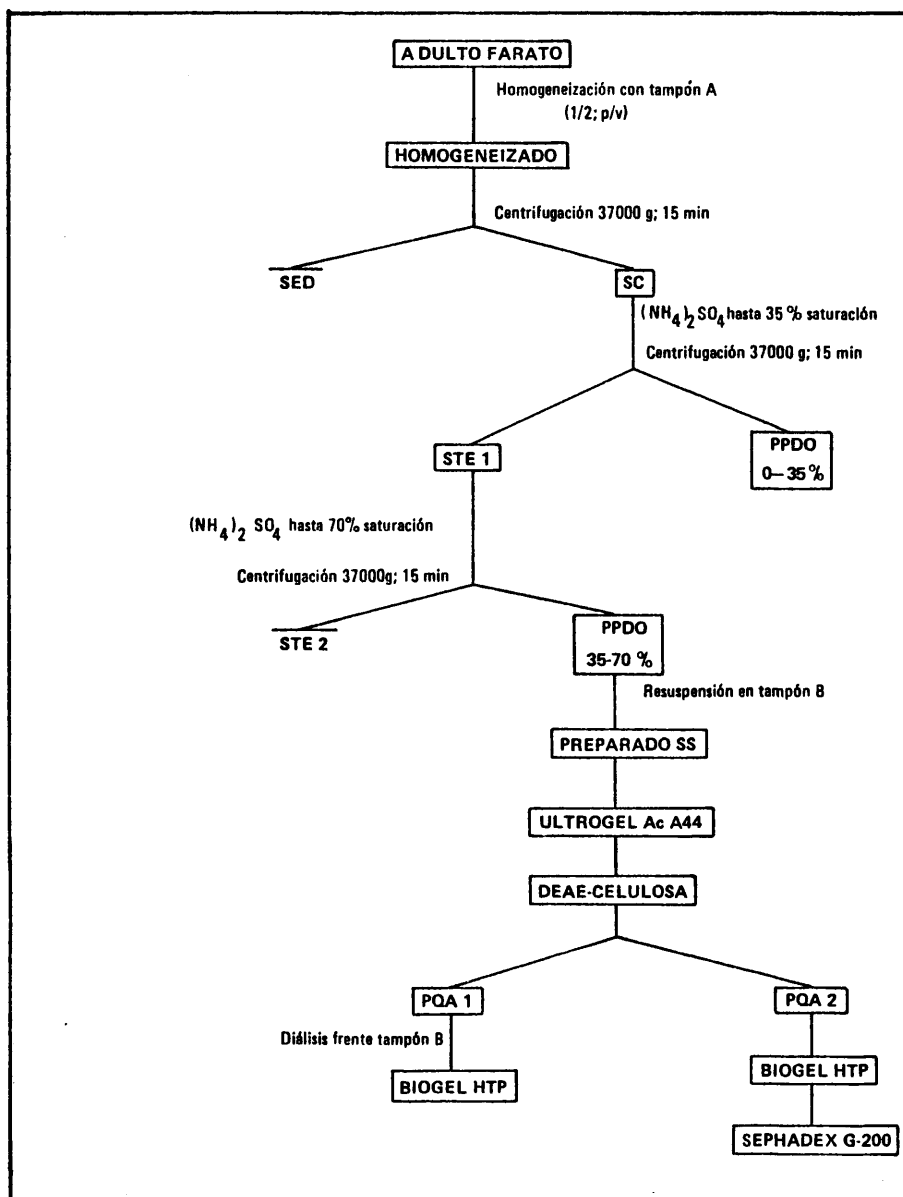
Los preparados concentrados en la etapa anterior se -- aplican en una columna (1.6 x 95 cm) de Sephadex G-200 equilibrada con tampón B. Se eluye con el mismo tampón a un flujo de 6 - ml/hora y se recogen fracciones de 2.5 ml.

Se ensaya la actividad quinásica de los eluidos de las dos cromatografías.

2.5. Proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble

2.5.1. Aislamiento y purificación

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el - ESQUEMA 1.



ESQUEMA 1.- PURIFICACION DE LAS PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE c AMP DE FRACCION SOLUBLE

2.5.1.1. Extracción

El material biológico (adulto farato de 5 días) se homogeneiza en un homogeneizador Omni-Mixer Sorvall, al máximo de revoluciones, durante tres periodos de 2 minutos con tampón A (fosfato potásico 10 mM a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM, -- EDTA 4 mM, acetato magnésico 10 mM y KCl 150 mM) en una proporción de 2 ml de tampón por gramo de tejido. En esta etapa, al igual -- que en las restantes del proceso de purificación, se mantiene una temperatura entre 0-6° C.

El homogeneizado se centrifuga en una centrifuga Sorvall RC2-B (rotor SS-34) refrigerada (0-4°C) durante 15 min a 37.000 g obteniéndose después de filtrar por gasa el sobrenadante de centrifugación, SC, en el que se encuentra la fracción soluble.

La fuerza iónica óptima del tampón de homogeneización -- se determina ensayando la actividad proteína quinásica de distintos sobrenadantes de centrifugación, SC, previamente dializados -- frente a tampón B, obtenidos al homogeneizar una misma cantidad -- de adulto farato de 5 días (10 g), con tampones tipo A de fuerza/ iónica creciente (0-500 mM de KCl).

2.5.1.2. Precipitación con sulfato amónico

El sobrenadante de centrifugación, SC, se lleva hasta -- el 35% de saturación de sulfato amónico mediante adición de la -- sal en polvo fino, lentamente (1 g /min aproximadamente) y con -- agitación suave durante dos horas en baño de hielo. Se centrifuga a 37.000 g durante 15 min recogiendo el sobrenadante que de forma

similar se lleva hasta el 70% de saturación de sulfato amónico./ Transcurridas dos horas se procede a una nueva centrifugación y/ el precipitado obtenido (35-70% de saturación de sulfato amónico) se redisuelve en el mínimo volumen de tampón B para obtener el - preparado que se denomina SS, que generalmente se vuelve a cen-- trifugar en análogas condiciones para eliminar partículas en sus pensión que pueden obstruir las columnas cromatográficas.

La curva de solubilidad de la enzima en función de la/ fuerza iónica del medio se determina llevando el sobrenadante de centrifugación, SC, a porcentajes de saturación de sulfato amónico comprendidos entre el 20 y el 70% con aumentos sucesivos del/ 10%. Los seis precipitados obtenidos se redisuelven en tampón B/ y se dializan en bolsas Visking Tubing 20/32 frente al mismo tam pón durante una noche antes de proceder al ensayo de actividad./ Para medir la actividad enzimática del preparado SS (35-70% - de saturación de sulfato amónico) es preciso dializarlo también/ previamente frente a tampón B.

2.5.1.3. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel AcA 44)

El preparado SS se cromatografía en una columna (2.5 x 65 cm o 4 x 72 cm) de Ultrogel AcA 44 equilibrada con tampón B./ Se eluye con el mismo tampón recogiendo fracciones de 7 ó 17 ml, según el tamaño de la columna, en un colector automático LKB 2112 Redirac.

El perfil de proteína a lo largo de la elución se deter mina midiendo la absorción a 280 nm con un espectrofotómetro de/ flujo continuo LKB Uvicord II 8300, conectado a un registro LKB/ Chopper Bar Recorder 6520, que lleva acoplado un sistema que --

cambia automáticamente el color de la impresión en el registro - al hacerlo la fracción colectada, lo que permite relacionar con - facilidad el perfil de absorbancia con las fracciones eluidas. - Si se requiere una correlación más precisa se utiliza un espectrofotómetro Varian Techtron 635.

Las cromatografías en columna se realizan en cámara -- fría (4-6° C) mientras no se indique lo contrario y los aparatos descritos aquí para la colectación de fracciones y determinación de absorbancias son los mismos para todas ellas por lo que en - lo sucesivo se omite su mención.

Esta segunda etapa de purificación sirve asimismo como desalado del preparado SS procedente de la precipitación con sulfato amónico.

2.5.1.4. Cromatografía de cambio iónico (DEAE-celulosa)

Las fracciones del eluido de Ultrogel AcA 44 coincidentes con el máximo de actividad se cromatografían en una columna (1.6 x 25 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con tampón B. Para la elución se aplica un gradiente lineal de 10-250 mM de fosfato potásico (200 ml de cada tampón a pH 7 conteniendo 7 mM de 2-mercaptoetanol) y se recogen fracciones de 12 ml.

Cuando se ensaya la actividad quinásica de las fracciones del eluido aparecen dos máximos que exhiben dependencia de - cAMP y que se denominan PQA-1 y PQA-2.

2.5.1.5. Diálisis

Las fracciones del eluido de DEAE-celulosa correspondientes a PQA-1 se mezclan y se dializan frente a tampón B como se indica en el apartado 2.4.4.

2.5.1.6. Cromatografías de adsorción (Biogel HTP)

La muestra PQA-1 dializada se cromatografía en una columna (1.4 x 17 cm) de Biogel HTP (hidroxiapatito) equilibrada con tampón B. Se eluye con un gradiente lineal de 10-250 mM de fosfato potásico formado con 75 ml de cada tampón a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM y se recogen fracciones de 5 ml.

Por otra parte, las fracciones correspondientes al segundo máximo de actividad quinásica del eluido de DEAE-celulosa, PQA-2, se cromatografían directamente, sin diálisis previa, en una columna de hidroxiapatito de dimensiones similares a la utilizada para PQA-1, equilibrada con tampón fosfato 100 mM a pH 7, conteniendo 7 mM de 2-mercaptoetanol. Se eluye con un gradiente de 100-250 mM de fosfato (100 ml de cada tampón a pH 7, conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM) y se recogen fracciones de 5 ml.

2.5.1.7. Concentración

Las fracciones correspondientes al máximo de actividad quinásica del eluido de PQA-2 de hidroxiapatito se concentran frente a polietilenglicol como se indica en el apartado 2.4.6.

2.5.1.8. Cromatografía de penetrabilidad (Sephadex G-200)

El preparado de PQA-2 concentrado se aplica en una columna (1.6 x 95 cm) de Sephadex G-200 equilibrada con tampón B./ Se eluye con el mismo tampón a un flujo de 6 ml/hora recogiendo/ fracciones de 3.3 ml.

2.5.2. Conservación

Los preparados enzimáticos altamente purificados de - PQA-1 y PQA-2 se conservan a -70°C estabilizados con albúmina. - Para determinar la concentración de proteína requerida, se añaden cantidades crecientes de albúmina hasta un máximo de 1 mg/ml. Los preparados enzimáticos obtenidos se congelan a -70°C y se mide la actividad quinásica de los mismos después de descongelados.

2.5.3. Equilibrio de agregación

2.5.3.1. Influencia del tiempo

Se aplican 4 ml del preparado SS (35-70% de saturación de sulfato amónico) obtenido como se indica en el ESQUEMA 1 en una columna (2.6 x 65 cm) de Ultrogel AcA 44 equilibrada con tampón B. Se eluye con el mismo tampón recogiendo los primeros 83 ml en probeta y el resto en fracciones de 5 ml.

A las 24 horas, se cromatografían en idénticas condiciones 2 ml del preparado enzimático conservado en cámara fría - (4-6°C).

A las 48 horas se aplican 2 ml del mismo preparado en/

una columna (2.6 x 90 cm) de Sephadex G-100 equilibrada con tampón B. Se eluye con el mismo tampón, recogién dose 135 ml en probeta y el resto en fracciones de 6.7 ml.

El efecto del tiempo en la agregación se determina comparando los perfiles de actividad quinásica de los tres eluidos.

2.5.3.2. Influencia de la fuerza iónica

Se aplican 10 ml de un preparado SS, conservado en cámara fría durante 48 horas, en una columna (4 x 72 cm) de Ultrogel AcA 44 equilibrada con tampón B y se eluye con el mismo tampón, recogién dose fracciones de 18 ml. Se ensaya la actividad quinásica en presencia de cAMP y 10 ml de la fracción correspondiente al máximo del primer pico se cromatografían en las mismas condiciones pero con una columna equilibrada con tampón B conteniendo 150 mM de KCl, eluyendo con el mismo tampón. Se ensaya la actividad quinásica y se comparan los perfiles de actividad de ambos eluidos.

2.5.3.3. Influencia de la concentración de proteínas

Se aplican 3 ml de los sobrenadantes de centrifugación, SC, obtenidos a partir de adulto farato de 5 días e insecto adulto en una columna (2.5 x 65 cm) de Ultrogel AcA 44 equilibrada con tampón B. Se eluye con el mismo tampón recogién dose fracciones de 8.5 ml. Se llevan a cabo también dos cromatografías similares de los mismos preparados pero con la columna equilibrada con tampón B conteniendo 150 mM de KCl, eluyendo con este mismo tampón.

Se ensaya la actividad quinásica y se comparan los perfiles obtenidos para los cuatro eluidos.

2.5.4. Determinación de pesos moleculares

Se utiliza una columna (1.3 x 76 cm) de Sephadex G-200 equilibrada con tampón Tris- HCl 50 mM, pH 7.3 (4°C), conteniendo KCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM y azida sódica al 0.02% (p/v), calibrada con las siguientes proteínas cuyo peso molecular se adjunta:

1. Citocromo c de corazón de caballo (12347 D) (323).
2. Mioglobina de cachalote (17816 D) (323).
3. Tripsina bovina (23566 D) (323).
4. Ovoalbúmina (43500 D) (324).
5. Triosafofato isómerasa de músculo de conejo (53180 D) (325).
6. L-glicerol -3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo -- (60.000 y 78.000 D) (326 y 327 respectivamente).
7. Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (79740 D) (323).
8. Gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (142800 D) (323).
9. Aldolasa de músculo de conejo (155812 D) (328).
10. Catalasa bovina (232096 D) (323).

Para el cálculo del peso molecular aparente de la holo enzima se aplican 200 µl del preparado purificado hasta la etapa de Biogel HTP (ver ESQUEMA 1), conteniendo glicerina al 10% (v/v). Se eluye con el tampón de equilibrado recogiendo fracciones de - 0.68 ml.

Para el cálculo del peso molecular aparente de las --

subunidades, se sigue una experimentación idéntica pero equilibrando y eluyendo con el mismo tampón conteniendo cAMP a una concentración de 10 μ M.

2.6. Aislamiento y purificación de la proteína quinasa dependiente de cGMP de fracción soluble.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el ESQUEMA 2.

2.6.1. Extracción

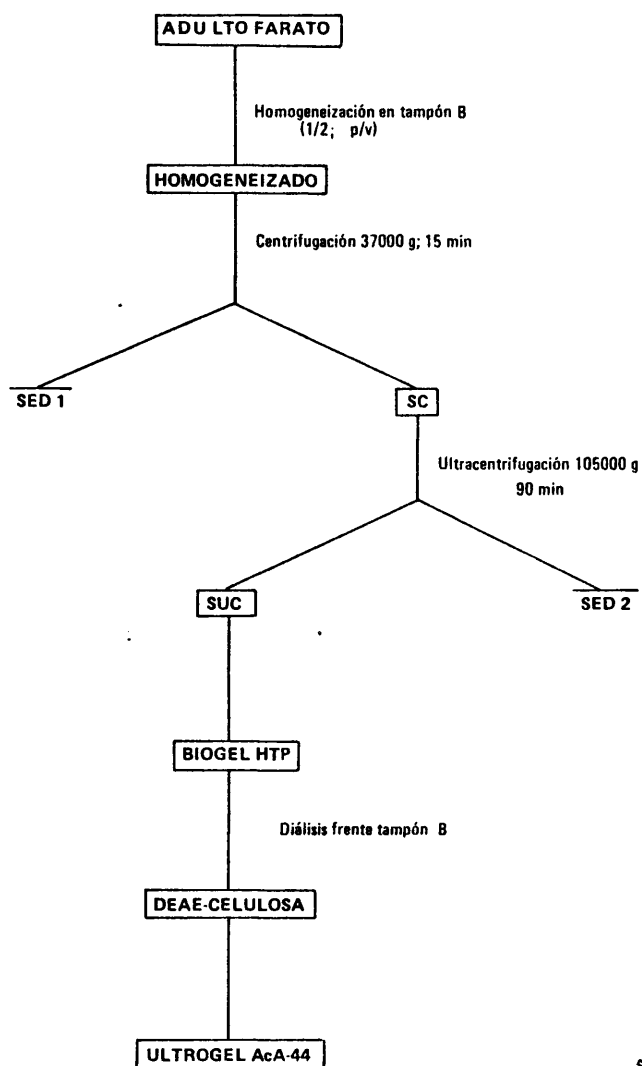
Se utiliza como material biológico adulto farato de 7 - días. La experimentación hasta la obtención del sobrenadante de centrifugación, SC, es similar a la descrita en 2.5.1.1. para la proteína quinasa dependiente de cAMP, con la salvedad de que en la homogeneización se utiliza tampón B.

2.6.2. Ultracentrifugación

El sobrenadante de centrifugación, SC, se ultracentrifuga en una ultracentrífuga Beckman -L4 (rotor R-40) durante 90 min, para eliminar algunas partículas que pudieran permanecer en suspensión y obstruir las columnas cromatográficas.

2.6.3. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)

El sobrenadante de ultracentrifugación, SUC, se aplica a una columna (2 x 20 cm) de Biogel HTP equilibrada con tampón B.



ESQUEMA 2.- PURIFICACION DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE cGMP.



La elución se efectúa primero con un gradiente de 10-250 mM de - fosfato potásico (75 ml de cada tampón a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM, recogién dose fracciones de 2 ml, y se completa con fosfato potásico 250 mM a pH 7, conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM, colectando fracciones del mismo volumen.

2.6.4. Diálisis

Las fracciones del eluido de Biogel HTP correspondientes al pico de actividad de proteína quinasa dependiente de cGMP se dializan frente a tampón B de forma similar a como se ha descrito en 2.4.4.

2.6.5. Cromatografía de cambio iónico (DEAE -celulosa)

La muestra dializada con actividad de PQG se aplica en una columna (1 x 9.5 cm) de DEAE-celulosa, equilibrada con tampón B. Se eluye con un gradiente de 10-250 mM de fosfato potásico (30 ml de cada tampón a pH 7, conteniendo 2-mercaptoetanol -- 7 mM), recogién dose fracciones de aproximadamente 2.3 ml.

2.6.6. Concentración

Las fracciones correspondientes al máximo de actividad quinásica del eluido del DEAE-celulosa, se concentran frente a - polietilenglicol como se ha descrito en el apartado 2.4.6.

2.6.7. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel Aca 44)

El preparado concentrado (3.5 ml) se aplica en una columna (4 x 72 cm) de Ultrogel Aca 44 equilibrada con tampón B. -

Se eluye con el mismo tampón y se recogen fracciones de 9 ml.

2.7. Aislamiento y purificación de las proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos de fracción soluble.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el --
ESQUEMA 3.

2.7.1. Extracción.

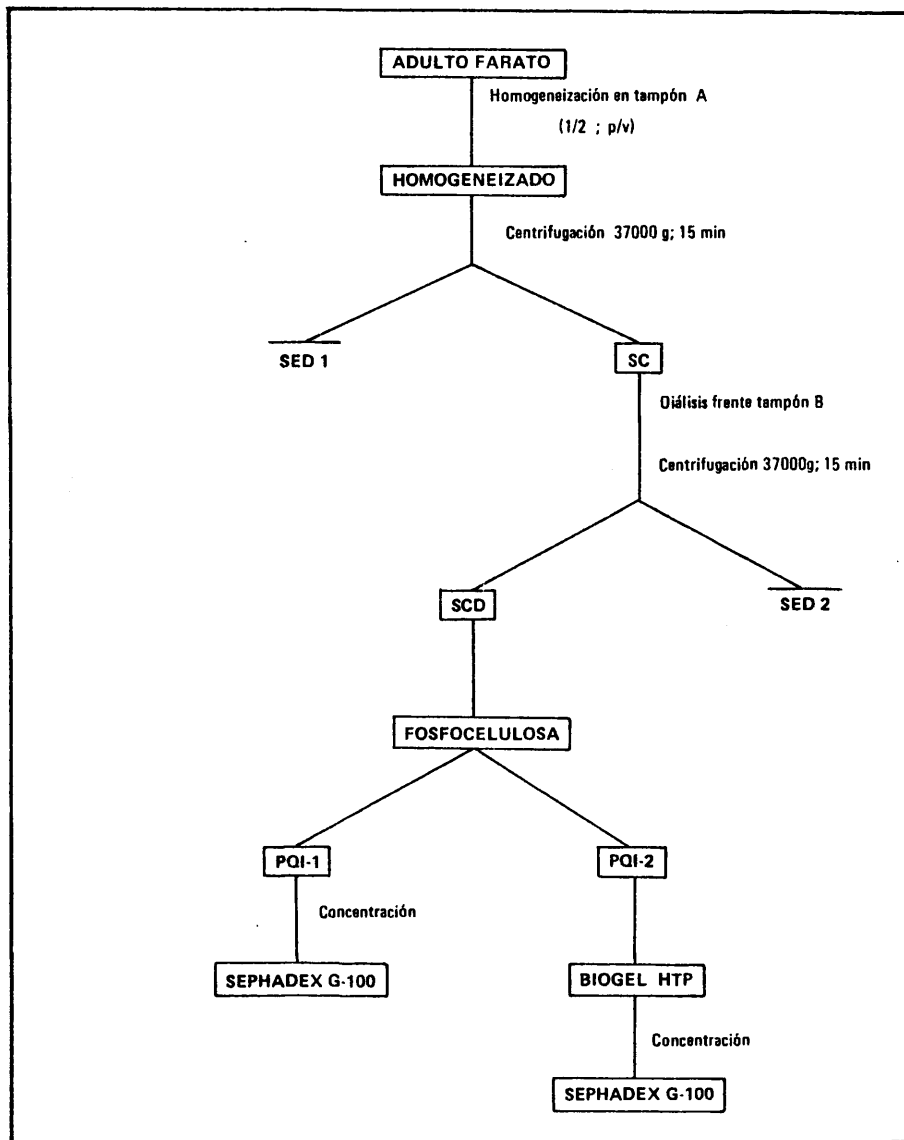
La experimentación es similar a la descrita en el apartado 2.5.1.1. El material biológico de partida es adulto farato de 7 días.

2.7.2. Diálisis.

El sobrenadante de centrifugación, SC, se introduce en una bolsa de diálisis Visking Tubing 18/32 y se dializa frente a/ tampón B durante una noche en cámara fría (4-6° C) con agitación/ suave, para eliminar el KCl. Después se centrifuga en una centrífuga Sorvall RC2-B a 37.000 g durante 15 min para eliminar agregados y partículas en suspensión que se forman durante el proceso de diálisis con lo que se obtiene un sobrenadante de centrifugación dializado que se llama SCD.

2.7.3. Cromatografía de cambio iónico (Fosfocelulosa).

El preparado SCD se aplica en una columna (1.4 x 17 cm) de fosfocelulosa equilibrada con tampón B. Una vez cargada la -- muestra se lava la columna con 4-5 volúmenes de tampón B para eliminar la actividad de proteína quinasa no retenida, se aplica un/



ESQUEMA 3.- PURIFICACION DE LAS PROTEINA QUINASAS INDEPENDIENTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.

gradiente de 10-200 mM de fosfato potásico (100 ml de cada tampón a pH 7, conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM) y se recogen fracciones de 5 ml. En el eluido se detectan dos máximos de actividad --quinásica, independientes de nucleotido cíclico, que se denominan PQI-1 y PQI-2, según su orden correlativo de elución.

2.7.4. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP)

Se mezclan las fracciones correspondientes a PQI-2 y se aplican en una columna (1.4 x 17 cm) de hidroxiapatito equilibrada con tampón fosfato potásico 200 mM a pH 7, conteniendo --2-mercaptoetanol 7 mM. Una vez cargada la muestra, se lava la columna con 3 volúmenes del tampón de equilibrado antes de aplicar/ un gradiente de 200-500 mM de fosfato potásico (75 ml de cada tam--pón a pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM) y se recogen fraccio--nes de 5 ml.

2.7.5. Concentración.

Según la experimentación descrita en 2.4.6 y con las mismas limitaciones allí expuestas, se concentran los preparados/ de PQI-1 de la fosfocelulosa y PQI-2 del hidroxiapatito.

2.7.6. Cromatografías de penetrabilidad.

El preparado de PQI-1 concentrado (8 ml) se aplica -- en una columna (2.5 x 86 cm) de Sephadex G-100 equilibrada con -- tampón B. Se eluye con este mismo tampón manteniendo un flujo de/ 20 ml/h, con una presión hidrostática máxima de 40 cm de agua, reco--giéndose primero 135 ml en probeta y después fracciones de 6.7 ml.

El preparado de PQI-2 procedente del Biogel HTP (concentrado hasta 8 ml) se cromatografía en Sephadex G-100 en idénticas condiciones que PQI-1.

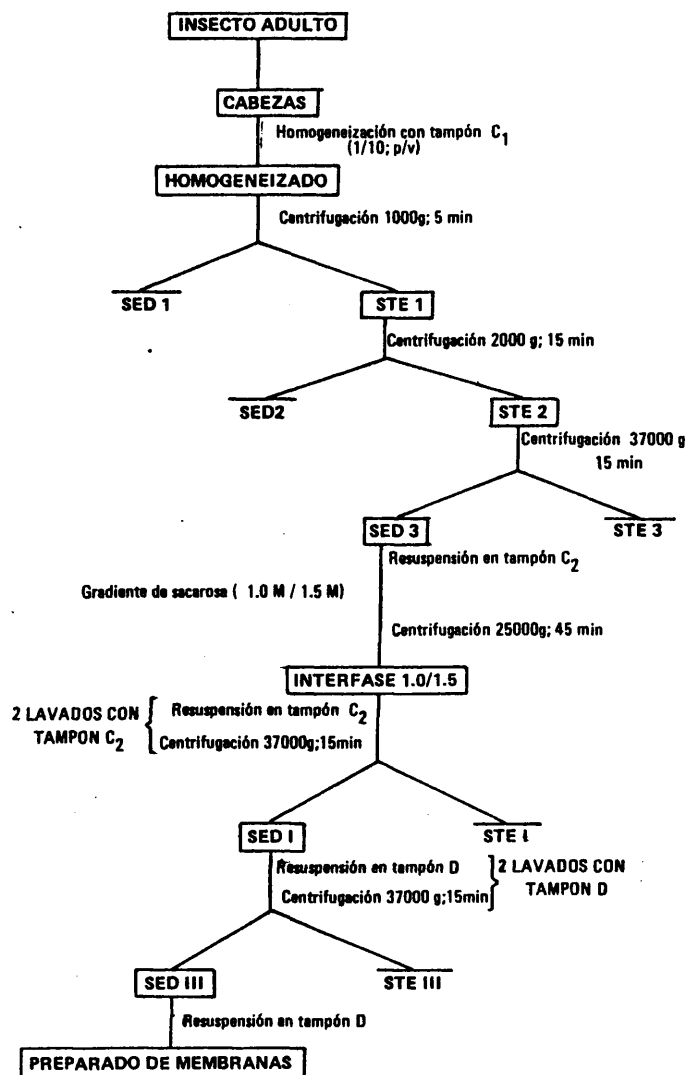
2.8. Proteína quinasas asociadas a membranas.

2.8.1. Obtención de los preparados de membranas.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el --
ESQUEMA 4.

Para la obtención del preparado de membranas se homogeneizan 4 g de cabezas de insecto adulto con 40 ml de tampón Tris HCl 50 mM, pH 7.5 (25° C) conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM (en lo sucesivo tampón C₁) en Potter-Elvehjem provisto de un émbolo de teflón (diez emboladas a 2.000 rpm, sin que la temperatura exceda los 4° C). El homogeneizado resultante se centrifuga a 1000 g durante 5 minutos y el sobrenadante (STE 1) se centrifuga a 2000 g durante 15 min. Se vuelve a centrifugar el sobrenadante obtenido (STE 2) a 37.000 g durante 15 min y el sedimento (SED 3) se resuspende en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25° C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM (en lo sucesivo tampón C₂).

La suspensión se aplica en un gradiente discontinuo formado con sacarosa 1.0 y 1.5 M (15 ml de cada concentración preparadas en tampón C₂) y se centrifuga a 25.000 g durante 45 min. La interfase 0.1 M de sacarosa se extrae con una jeringa o pipeta Pasteur y se lava dos veces con 45 ml de tampón C₂ (resuspendiendo en el tampón y centrifugando a 37.000 g durante 15 min) ,



ESQUEMA 4.- OBTENCION DEL PREPARADO DE MEMBRANAS

volviendo a lavar el sedimento resultante (SED II) con 45 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37° C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM (en lo sucesivo tampón D).

Finalmente, el sedimento obtenido (SED III), se resuspende en tampón D para conseguir una preparación de membranas - con una concentración de proteínas de 1-2 mg/ml.

Todas estas operaciones se realizan entre 0-4° C.

Las centrifugaciones se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B, equipada con rotor SS-34, salvo para la centrifugación en gradiente discontinuo en la que se emplea el rotor flotante HB-4 para evitar distorsiones del gradiente.

En otro tipo de experiencias, se aplica el SED 3 (ESQUEMA 4) resuspendiendo en tampón C₂, en la fracción 1.0 M de un gradiente discontinuo de sacarosa formado con tampón C₂ y concentraciones de sacarosa de 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50 M en el mismo tampón (6 ml de cada componente).

Después de centrifugar en Sorvall RC2-B (rotor HB-4) a 25.000 g durante 45 min, se recogen con pipeta Pasteur o jeringa las interfases 0-0.50 M, 0.50-0.75 M, 0.75-1.00 M, 1.00-1.25 M y 1.25-1.50 M que se denominan preparados A,B,C,D y E respectivamente y el sedimento que se denomina preparado F. A partir de este momento se sigue la experimentación que se detalla en el ESQUEMA 4.

Por otra parte, el SED 2 (ESQUEMA 4) se resuspende en/

sacarosa 1.5 M y se centrifuga en una centrífuga Sorvall RC2-B. - El sedimento obtenido se resuspende en tampón D después de haberle lavado dos veces con el mismo tampón.

Se valoran las proteínas de los preparados obtenidos y - se ensaya la actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP, corrigiendo los valores obtenidos en función de la actividad inhibidora endógena (ver apartado 2.11.5).

2.8.2. Aislamiento y purificación

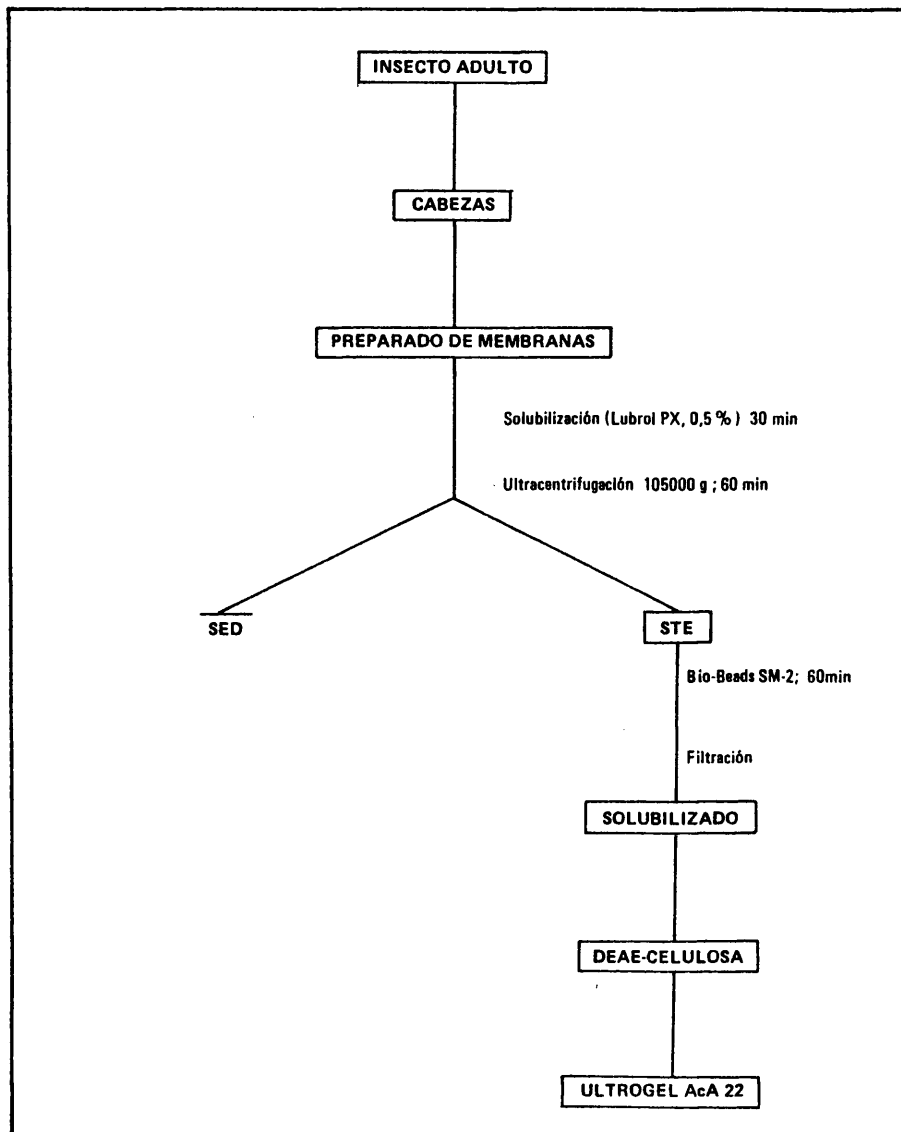
Las etapas del proceso de encuentran resumidas en el -- ESQUEMA 5.

2.8.2.1. Solubilización

Se lleva a cabo resuspendiendo la fracción particulada, obtenida según se describe en 2.8.1. en un tampón Tris-HCl -50 mM pH 7.5 (25° C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5mM, $MgSO_4$ 5mM, sacarosa 100 mM y lubrol pX 0.5% (p/v), denominado tampón de solubilización, de tal forma que la proporción proteína/detergente sea de 1/5 (p/p). Se agita durante 30 min en baño de hielo y se Ultracentrifuga a 105.000 g, en una ultracentrifuga Beckman -L4 - (rotor R-40) durante 60 min recogiendo el sobrenadante en el que se encuentra la proteína solubilizada.

2.8.2.2. Eliminación del detergente

Se utiliza una resina de estireno y divinilbenceno comercializado con el nombre de Bio-Beads SM-2 (20-50 mallas), que se añade al sobrenadante de ultracentrifugación en una proporción



ESQUEMA 5.- PURIFICACION DE LA PROTEINA QUINASA DE FRACCION PARTICULADA

de 1 g por cada 4 ml (lo que supone 1 g de resina por 20 mg de detergente). Se agita la mezcla en baño de hielo durante una hora, transcurrida la cual se elimina el Bio-Beads SM-2 filtrando a través de lana de vidrio.

2.8.2.3. Cromatografía de cambio iónico (DEAE -celulosa).

El filtrado de la etapa anterior se aplica en una columna (1.5 x 10 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con tampón D. Se eluye con un gradiente continuo de fuerza iónica conseguido mediante un formador de gradientes al que se añaden 100 ml de tampón de equilibrado y otros 100 ml del mismo tampón conteniendo NaCl 0.5 M y se recogen fracciones de 5 ml.

2.8.2.4. Concentración.

Las fracciones del eluido de DEAE-celulosa con actividad proteína quinásica dependiente de cAMP se introducen en una bolsa de diálisis Visking Tubing 18/32 y se concentran frente a polietilenglicol al 30% (p/v) en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 (25°C) conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5mM, $MgSO_4$ 5mM, sacarosa 100 mM y lubrol PX 0.01% (p/v).

La diálisis se efectúa en cámara fría (4-6° C) con agitación constante.

2.8.2.5. Cromatografía de penetrabilidad (Ultrogel AcA 22).

El preparado concentrado de la etapa anterior (0.5 ml)/ se carga por densidad (añadiendo sacarosa en polvo), en una columna (1.6 x 22 cm) de Ultrogel AcA 22 equilibrada con tampón Tris-HCl

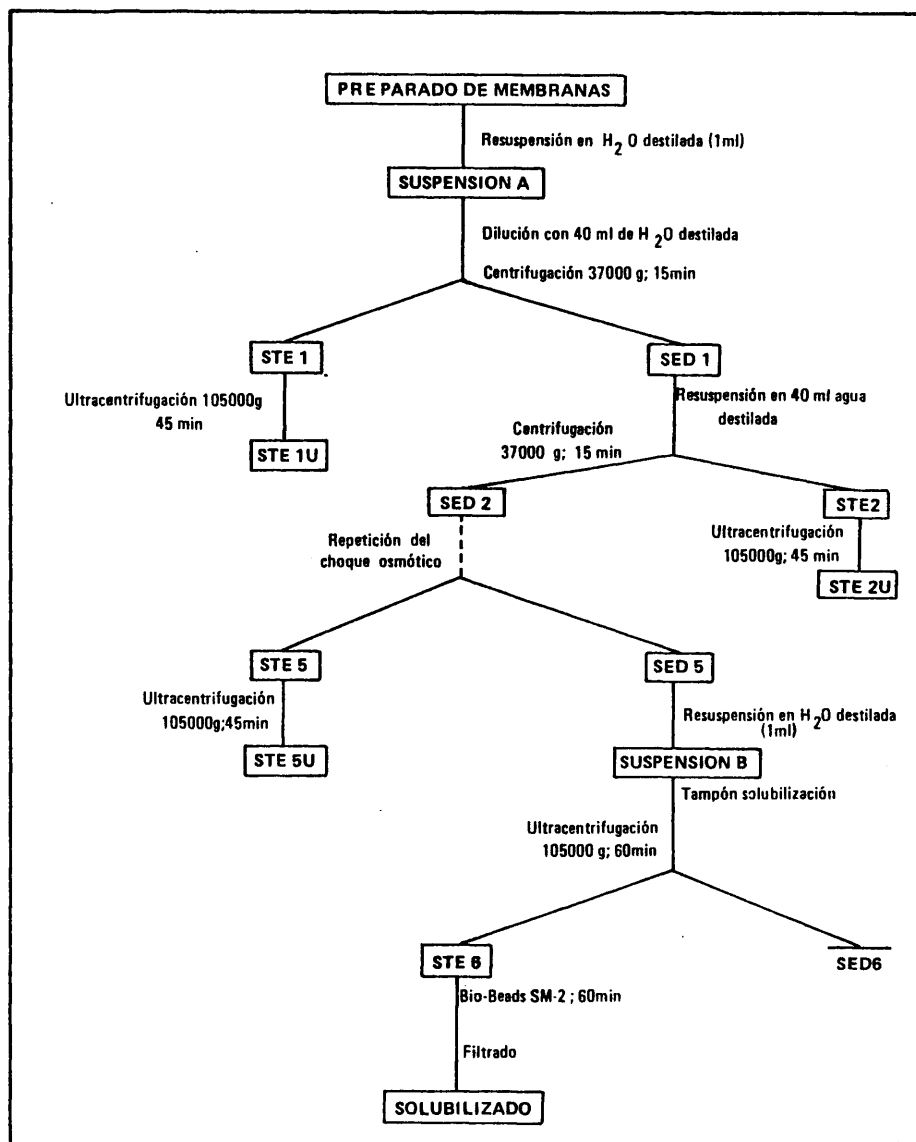
50 mM, pH 7.5 (25°C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF - 5mM, MgSO_4 5mM, sacarosa 100 mM y lubrol PX 0.01%, previamente/ calibrada con las siguientes proteínas:

1. Glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (2.000.000 D) (329).
2. Tiroglobulina de tiroides bovino (669.000 D) (330).
3. Catalasa bovina (232.000 D) (323).
4. α -Amilasa de *Bacillus subtilis* (97.600 D) (331).

Se eluye con el tampón de equilibrado manteniendo un - flujo de 7 ml/hora que proporciona una presión hidrostática de - 30 cm de agua y se recogen fracciones de 1.17 ml. El volumen de/ elución de la proteína quinasa asociada a membrana se determina/ mediante el ensayo de la actividad enzimática, y el de las pro-- teínas patrones espectrofotométricamente.

2.8.3. Separación de dos actividades de proteína quinasa mediante choque osmótico del preparado de membranas.

Las etapas del proceso están resumidas en el ESQUEMA 6. Un preparado de membranas obtenido como se ha descrito en 2.8.1. se resuspende en 1 ml de agua destilada, se toma una alícuota de esta suspensión (que se denomina suspensión A) para ensayos de - actividad y se diluye con 40 ml de agua destilada. Se mantiene - durante 15 min agitando periódicamente con una varilla de vidrio y se centrifuga a 37.000 g durante 15 min en una centrífuga -- Sorvall RC2-B refrigerada (0-4°C). El sobrenadante resultante - (STE 1), que presenta una cierta turbidez se ultracentrifuga a - 105.000 g en una ultracentrifuga Beckman-L4 (rotor R-40), obte-- niéndose el sobrenadante de ultracentrifugación (STE 1U).



ESQUEMA 6.- SEPARACION DE DOS PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE cAMP MEDIANTE CHOQUE OSMOTICO DEL PREPARADO DE MEMBRANAS.

El choque osmótico hipotónico se repite cuatro veces - consecutivas obteniéndose al final del proceso un sedimento -- (SED 5) que se resuspende en 1 ml de agua destilada resultando - la denominada suspensión B de la cual se toma una alicuota para/ ensayos de actividad. Al resto se añaden 8 ml de tampón de solu- bilización y se procede a un tratamiento similar al descrito en los apartados 2.8.2.1 y 2.8.2.2. hasta obtener un preparado solu- bilizado de membranas del que se ha eliminado el detergente.

2.9. Caracterización eszimática.

Utilizando los distintos preparados enzimáticos purifi- cados se ensaya la actividad de proteína quinasa y ligante de/ nucleotidos cíclicos como se describe en los apartados 2.2.1 y - 2.2.2, respectivamente, variando en cada caso la concentración o/ naturaleza de alguno de los componentes de la mezcla de reacción o incluyendo en la misma algún otro factor según el efecto que - se pretenda estudiar.

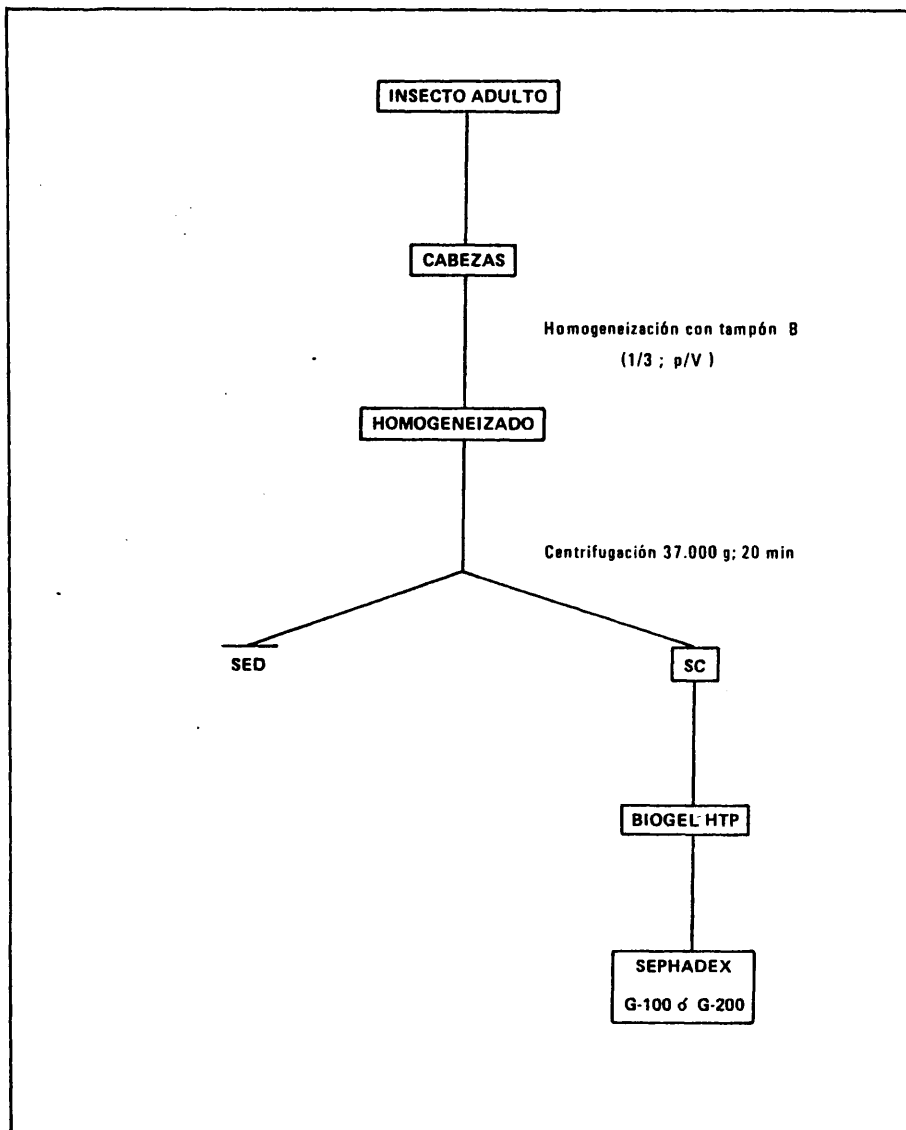
2.10. Proteína ligante de cAMP (PL).

2.10.1 Aislamiento y purificación.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el - ESQUEMA 7.

2.10.1.1. Extracción.

Las cabezas de insecto adulto (3-4g), que es el mate-- rial biológico utilizado, se homogeneizan en tampón B en un homo



ESQUEMA 7.- PURIFICACION DE LA PROTEINA RECEPTORA DE cAMP

geneizador Potter-Elvehjem, equipado con émbolo de teflón, durante tres periodos de dos minutos, en cuyos intervalos se sumerge el recipiente en baño de hielo. La proporción utilizada es de 3 ml de tampón por gramo de tejido. Después se centrifuga el homogeneizado a 37.000 g durante 20 min en una centrifuga Sorvall RC2-B -- (rotor SS-34) refrigerada (0-4°C). Se filtra el sobrenadante por/gasa y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones filtrando después a través de lana de vidrio muy compactada.

2.10.1.2. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP).

El sobrenadante de centrifugación, SC, obtenido en el -- proceso de extracción se aplica en una columna (1.6 x 17 cm) de -- Biogel HTP equilibrada con tampón B y se eluye con un gradiente -- lineal de 10-200 mM de fosfato potásico (45 ml de cada tampón a -- pH 7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM) recogiendo fracciones de/ 3.3 ml. Se completa la elución con fosfato potásico 200 mM a pH/ 7 conteniendo 7 mM de 2-mercaptoetanol, colectando fracciones del mismo volumen.

2.10.1.3. Concentración.

Se utilizan dos métodos en función del volumen final -- deseado. Las fracciones correspondientes al pico de actividad li- gante de cAMP, carente de actividad quinásica, del eluido del hi- droxiapatito, se introducen en una bolsa de diálisis Visking Tu-- bing 13/32 y se dializan frente al polietilenglicol al 20% (p/v)/ en tampón B, con agitación, en cámara fría (4-6°C) hasta un volu- men de aproximadamente 5 ml.

Cuando se precisa una mayor concentración para aplicar/

en columnas de menor tamaño, lo que se hace es precipitar con sulfato amónico hasta el 70% de saturación (como se ha descrito en 2.5.1.2) resuspendiendo el precipitado en el mínimo volumen de tampón B.

2.10.1.4. Cromatografías de penetrabilidad (Sephadex G-100 y Sephadex G-200).

El preparado concentrado (aproximadamente 500 μ l) de la etapa anterior se aplica en una columna (1.6 x 95 cm) de Sephadex G-200 equilibrada con tampón B y se eluye con el mismo tampón a un flujo de 7 ml/h recogiendo fracciones de 3.3 ml. Cuando se utiliza el Sephadex G-100 no es preciso un preparado muy concentrado (aproximadamente 5 ml) y éste se aplica en una columna (2.6 x 90 cm) equilibrada con tampón B. Se eluye con el mismo tampón a un flujo de 20 ml/h recogiendo fracciones de 5 ml.

2.10.2. Interacción de la proteína ligante de cAMP con el sistema proteína quinasa.

Se ensaya la actividad quinásica de PQI-1, PQI-2 y del preparado de membranas en presencia de la proteína ligante de cAMP, PL. Los preparados utilizados para los tres tipos de enzimas provienen de la etapa del Sephadex G-100 (ESQUEMAS 3 y 7).

En el ensayo de actividad (apartado 2.2.1) se añade a la proteína quinasa cantidades crecientes de proteína ligante de cAMP y se preincuba la mezcla durante media hora antes de adicionar los sustratos de la enzima y el catión divalente. La incubación se efectúa en presencia de cAMP.

2.11. Aislamiento y caracterización de un inhibidor termoestable del sistema enzimático proteína quinasa.

2.11.1. Ensayo de la actividad inhibidora.

La detección de la actividad inhibidora de proteína quinasa se lleva a cabo como se indica en el apartado 2.2.1. utilizando preparados parcialmente purificados de PQA-2 y de la enzima extraída de membranas mediante choque osmótico (STE 1U) o la proteína quinasa de corazón bovino (tipo II) de procedencia comercial. Cuando se ensayan eluidos de columnas se ponen 25 µl de cada fracción.

2.11.2. Purificación.

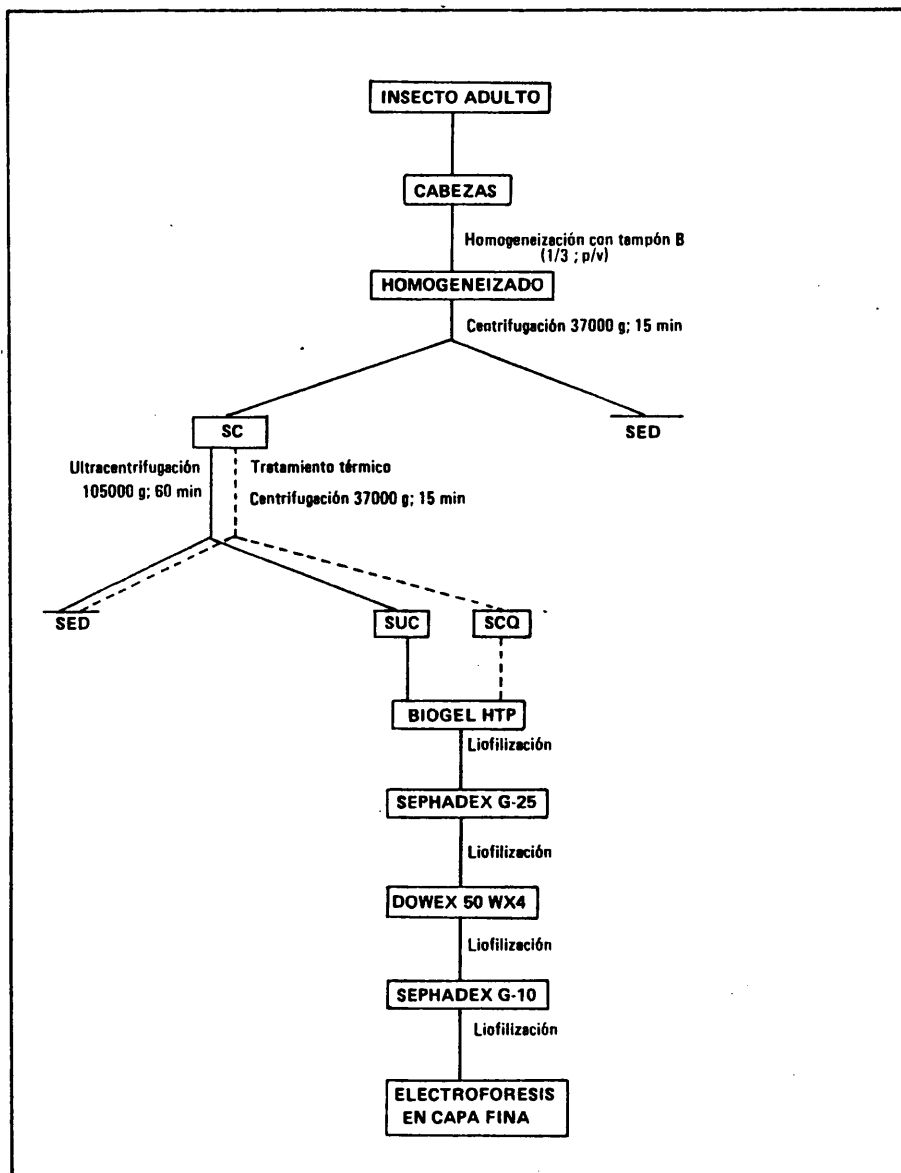
Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el -- ESQUEMA 8.

2.11.2.1. Extracción.

El proceso de extracción a partir de cabezas de insecto adulto (11g) es similar al descrito en el apartado 2.10.1.1. para la obtención de la proteína ligante de cAMP. El sobrenadante de centrifugación, SC, se ultracentrifuga a 105.000 g durante 60 min/ en una ultracentrifuga Beckman L4 (rotor R4) recogiendo el sobrenadante de ultracentrifugación, SUC.

2.11.2.2. Tratamiento térmico.

El sobrenadante de centrifugación, SC, obtenido en la -



ESQUEMA 8.- PURIFICACION DEL INHIBIDOR

etapa anterior se calienta en un baño a ebullición durante 15-20 min y se centrifuga a 37.000 g durante 15 min, desechando el sedimento donde se encuentran las proteínas desnaturalizadas y recogiendo el sobrenadante, SCQ.

2.11.2.3. Cromatografía de adsorción (Biogel HTP).

El preparado SUC se aplica en una columna (2.1 x 35 cm) de Biogel HTP equilibrada con tampón B. Se eluye con un gradiente de 10-200 mM de fosfato potásico (200 ml de cada tampón a pH/7 conteniendo 2-mercaptoetanol 7 mM), recogiendo fracciones de 13.5 ml. Se mide la inhibición de las actividades de proteína quinasa, de fosfoproteína fosfatasa y ligante de cAMP (25 µl de cada fracción en el ensayo).

Cuando se utiliza el tratamiento térmico, se aplica el preparado SCQ en una columna (1 x 13 cm) de Biogel HTP equilibrada con agua destilada y una vez cargada la muestra se lava la columna con dos volúmenes de agua destilada (20 ml) y el eluido se mezcla con la fracción no retenida.

2.11.2.4. Concentración.

El método utilizado para la concentración de las muestras entre las diversas etapas del proceso de purificación es la liofilización. Se liofilizan las fracciones correspondientes al máximo de actividad inhibidora de proteína quinasa del eluido resultante de cromatografiar el preparado SUC en Biogel HTP, o la fracción no retenida obtenida al cromatografiar en Biogel HTP el preparado SCQ.

2.11.2.5. Cromatografía de penetrabilidad (Sephadex G-25).

El liofilizado de la etapa anterior se redisuelve en el mínimo volumen de agua destilada (1.0 -1.5 ml) y se aplica en una columna (1.7 x 90 cm) de Sephadex G-25 equilibrada con agua destilada. Se eluye con agua destilada y se recogen fracciones de 2 ml.

Cuando se pretende la obtención de masa del inhibidor - se lleva a cabo, previamente a la mencionada, una cromatografía - de penetrabilidad en condiciones de resolución más groseras pero/ que permite la aplicación de mayores volúmenes. Así, el liofiliza do de la etapa anterior se redisuelve en agua destilada (hasta un volumen de 10-12 ml) y se carga en una columna (6 x 26.5 cm) de - Sephadex G-25 equilibrada con agua destilada. Se eluye con agua - destilada recogiendo los primeros 600 ml en probeta y después -- fracciones de 20 ml. Se mide la actividad inhibidora de proteína/ quinasa y se liofilizan las fracciones correspondientes al máximo El liofilizado se redisuelve en el mínimo volumen de agua destila da (1.0 -1.5 ml) y se recromatografía en Sephadex G-25 en las con diciones anteriormente indicadas.

2.11.2.6. Cromatografía de cambio iónico (Dowex 50W x 4)

Las fracciones del eluido de Sephadex G-25 correspon--- dientes al máximo de actividad inhibidora se liofilizan. Se redi suelve el liofilizado en agua destilada y se aplica en una colum na (0.6 x 3 cm) de Dowex 50W x 4 (200-400 mallas, forma H⁺)pre-- víamente lavada con HCl 0.1 N y equilibrada con agua destilada./ Se eluye sucesivamente con 10 ml de HCl 0.3 N y 5 ml de HCl 0.4N y se liofiliza esta última fracción.

2.11.2.7. Cromatografía de penetrabilidad (Sephadex G-10).

El liofilizado de la etapa anterior se redisuelve en - 200 μ l de agua destilada y se aplica en una columna (1 x 40 cm) de Sephadex G-10 equilibrada con agua destilada. Se eluye con agua - destilada y se recogen fracciones de 1 ml. En idénticas condiciones se cromatografían adenina y adenosina (100 μ l de una disolución de 5 mg/ml).

Se detectan los máximos de absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro Varian Techtron 635 y se mide su actividad inhibidora.

2.11.2.8. Electroforesis en capa fina.

Las fracciones del eluido de Sephadex G-10 correspondientes al máximo de absorbancia a 260 nm se mezclan y se liofilizan, se redisuelve el liofilizado obtenido en el mínimo volumen - de agua destilada y se procede a su aplicación en banda en una - placa de celulosa (Polygram Cel 300) de 100 μ de espesor a aproximadamente un tercio de uno de los extremos de la misma. Como controles se utilizan adenina, adenosina, AMP y ADP así como los -- aminoácidos glutámico, aspártico, glicocola y serina.

Se introduce la placa en una cámara de electroforesis - en capa fina (Desaga, Heidelberg), conteniendo un tampón de pH -- 4.4 formado por piridina, acético, acetona y agua en una proporción de 40:80:300:1520 (v/v). La electroforesis se mantiene durante dos horas a 400V.

Concluida ésta, se deja secar la placa a temperatura ambiente y se detectan las localizaciones correspondientes con luz ultravioleta a 254 nm utilizando un aparato Uvatom-70 (Atom) y se pulveriza con ninhidrina la placa parcialmente cubierta con una plancha de plástico de tal forma que únicamente quedan al descubierto la zona de los aminoácidos patrones y de uno de los extremos de la banda del inhibidor.

Para la medida de la actividad inhibidora se rascan las bandas detectadas mediante luz ultravioleta y se resuspende el polvo de celulosa en agua destilada. Para favorecer la extracción, se agita en un agitador magnético con una varilla de vidrio introducida en el tubo con lo que se consigue una mejor fragmentación de las partículas de celulosa. Se centrifuga a 4500 g durante 15 min en una centrífuga de mesa convencional (Wifug Labor) y los sobrenadantes obtenidos se filtran a vacío a través de filtros Oxoid (0.45 μ) antes de proceder al ensayo de la actividad inhibidora de proteína quinasa.

Por último, hay que señalar que cuando en el proceso de purificación del inhibidor (ESQUEMA 8) se incluye el tratamiento térmico, las etapas restantes del mismo se llevan a cabo a temperatura ambiente. En caso contrario, se mantiene una temperatura entre 4-6°C, con excepción de la electroforesis en capa fina.

2.11.3. Determinación de la naturaleza y características físicas.

2.11.3.1. Espectroscopía ultravioleta.

Los espectros de ultravioleta se realizan en un espec-

trofotómetro Cary 118 (Varian), con las muestras disueltas en -- agua destilada.

2.11.3.2. Análisis de aminoácidos.

Los análisis se llevan a cabo en un analizador automático Durrum modelo D500, equipado con un computador PDP-3M que - automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado.

- Hidrolizado de las muestras

Se introducen en un tubo pyrex (12 x 10 cm) 0.1 mg de proteína y se añaden 0.1 ml de HCl tridestilado azeótropo 5.7 M. El tubo se estira a la llama, se congela su contenido, y se hace vacío con una bomba durante un tiempo aproximado de 10 min. Se - cierra el tubo, manteniéndose el vacío. La hidrólisis se realiza a 108°C durante 18-20 horas. Finalizada la misma las muestras se llevan a sequedad en un desecador y se lavan cinco veces con 0.2/ ml de agua destilada.

- Análisis automático

Tanto el tampón de aplicación como los de elución son/ los suministrados por la casa comercial.

Las muestras secas se disuelven en 50 µl del tampón de aplicación, se pasan a un tubo de teflón (0.3 x 4 cm), se centrifuga, y 20 µl de la muestra obtenida se aplican a la columna del - analizador. La duración del análisis es de 100 min y finalizado/

el mismo se regenera la resina de la columna mediante lavado con NaOH 0.3N conteniendo 0.25g/l de EDTA.

2.11.3.3. Resonancia magnética nuclear.

Los espectros se obtienen en el Laboratorio de RMN del/ Instituto de Química Física Rocasolano (C.S.I.C., Madrid) con un/ espectrofotómetro Bruker HX-90(E) de campo magnético constante de 21 Kgauss correspondiente a una frecuencia de resonancia de -- 90 mHz para ^1H . Las muestras se intercambian previamente con D_2O .

2.11.3.4. Espectroscopia infrarroja.

Los espectros de infrarrojo se obtienen con un espectro- fotómetro Perkin-Elmer 580 B en el departamento de Física-Química Mineral del Instituto de Edafología (C.S.I.C., Madrid).

2.11.4. Tratamiento proteolítico.

Se incuba un sobrenadante de centrifugación obtenido me- diante tratamiento térmico, SCQ, con tripsina o pronasa con una re- lación entre la concentración de proteínas del preparado y la en- zima proteolítica de 10:1. En el primer caso se incuba a 37°C du- rante 3 h y en el segundo a 40°C durante 30 min. La detención de/ la reacción se efectúa calentando en baño a ebullición durante - 15 min. Seguidamente se enfría en baño de hielo y se ensaya la ac- tividad inhibidora.

2.11.5. Peso molecular.

El inhibidor utilizado es un preparado parcialmente pu-

rificado con tratamiento térmico hasta la etapa de Sephadex G-25 (ESQUEMA 8). La determinación del peso molecular aproximado se realiza sobre la base de los datos obtenidos de su diálisis a través de bolsas Visking Tubing 18/32, impermeables a sustancias de peso molecular superior a 6000 D y de la utilización de un sistema de concentración por ultrafiltración con Amicon modelo -202, equipado con una membrana UM-2, impermeable a sustancias de peso molecular superior a 1000 D, impulsada por una corriente de nitrógeno a una presión de 2-3 atm.

2.11.6. Otras características cromatográficas del inhibidor. Retención por adsorbentes.

El inhibidor utilizado es un preparado parcialmente purificado con tratamiento térmico hasta la etapa de Sephadex G-25 (ESQUEMA 8). La experimentación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

2.11.6.1. Cromatografía en capa fina (Celulosa).

El soporte cromatográfico se prepara con celulosa MN-300 en una proporción de 9 g de ésta por 54 ml de agua destilada y 2 ml de etanol. La mezcla se homogeneiza en una batidora y su contenido se reparte sobre placas de vidrio de 20 X 20 cm mediante un extendedor que se ajusta para obtener un grosor de las mismas de 250 o 500 μ y se dejan secar durante 24 h.

El preparado del inhibidor se aplica en banda y se desarrolla en un sistema butanol -acetona -acético- NH_3 (5%) - H_2O (7: 5: 3: 3: 2; v/v) durante aproximadamente una hora y media. -

Las placas se lavan previamente con el sistema con el fin de eliminar contaminantes que pudiera llevar el soporte. También se -- cromatografían, como controles, adenosina, hipoxantina, AMP, ADP/ y ATP.

Una vez retiradas las placas de las cubetas se dejan - secar a temperatura ambiente y se detectan las localizaciones correspondientes con luz ultravioleta a 254 nm utilizando un aparato Uvatom-70 (Atom).

La experimentación seguida para la elución de los pro- ductos visualizados con luz ultravioleta es la misma que se ha - descrito en el apartado 2.11.2.8.

2.11.6.2. Cromatografías de cambio iónico (DEAE-celulosa y Fos- focelulosa.)

Se aplican 1.5 ml del preparado del inhibidor en columnas (0.9 x 6 cm) de DEAE-celulosa y fosfocelulosa equilibradas - con agua destilada. Se eluye sucesivamente con agua destilada, - tampón fosfato potásico 100 mM y tampón fosfato potásico 250 mM, ambos de pH 7, recogiendo 4 fracciones de 3.4 ml de cada uno de/ ellos.

2.11.6.3. Adsorción por alúmina y carbón activo.

Se aplican 2.5 ml del preparado del inhibidor en una - columna (1 x 13 cm) de alúmina neutra equilibrada con agua destilada. Se eluye primero con agua destilada recogiendo 8 fracciones de 3.4 ml y después con tampones fosfato potásico 100 mM y 250 - mM a pH 7, recogiendo 12 fracciones del mismo volumen para cada/

uno de ellos.

Por otra parte, a un tubo de ensayo conteniendo 2 ml - del preparado del inhibidor se le añade una punta de espátula de carbón activo y se agita durante unos minutos. Se centrifuga a - 4500 g en una centrífuga de mesa convencional (Wifug Labor) y el sobrenadante obtenido se filtra a vacío a través de filtros -- Oxoid (0.45 μ) antes de proceder a la medida de la actividad inhi**bi**bidora.

2.11.7. Actividad inhibidora asociada a fracción particulada.

Para corregir los valores de la actividad de proteína/quinasa de los preparados de fracción particulada SED 2, SED 3, / A,B,C,D,E, y F obtenidos como se describe en el apartado 2.8.1./ se toman alicuotas de los mismos y se someten a un tratamiento - térmico como se indica en el apartado 2.11.2.2. A continuación - se ensaya la actividad inhibidora por 50 μ l que es el volumen - utilizado para la medida de la actividad de proteína quinasa de/ los distintos preparados.

2.12. Valoración de proteínas

Se utilizan dos métodos, el de Ross y Schafz (332) y el de Dulley y Grieve (333) que permiten la eliminación de algunas/ interferencias que se producen en la valoración por el método de Lowry (334). Con el primero, la de los grupos tiólicos presentes en los tampones que pueden alterar significativamente los valores obtenidos sobre todo con preparados enzimáticos altamente purifi**ci**cados y con el segundo la del detergente presente en los prepara**do**s solubilizados de membranas.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Purificación de (γ - 32 P)ATP.

En la FIG 11 se muestra la resolución en Dowex AG 1 x 4 (Cl^-) de (γ - 32 P)ATP y ortofosfato. Además de la purificación del ATP, mediante una cromatografía de este tipo se puede determinar la extensión de la hidrólisis, habiéndose comprobado que la descomposición de (γ - 32 P)ATP conservado a -70°C en etanol-agua al 50% durante tres semanas es de aproximadamente el 5%.

3.2. Estudios preliminares.

3.2.1. Actividades proteína quinásicas y ligantes de nucleótidos/cíclicos en distintas etapas del desarrollo.

Siguiendo una experimentación similar a la realizada en las primeras publicaciones sobre proteína quinasas de insectos -- (189, 301 y 302), se cromatografían en hidroxapatito los preparados obtenidos a partir de larva de 6 días y adulto farato de 5 días mediante tratamiento ácido y precipitación con sulfato amónico. - En las FIG 12 y 13 se muestran, respectivamente, las actividades/

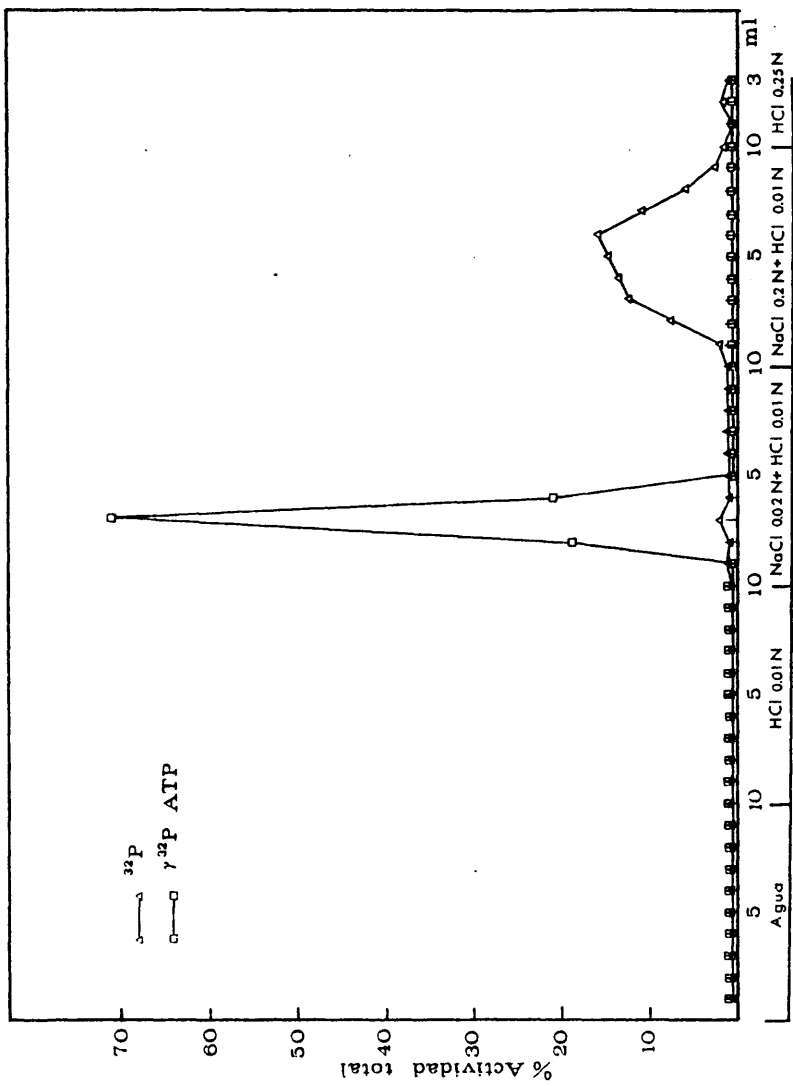


FIG. 11.- Resolución en Dowex AG 1x4 (Cl^-) de (γ ^{32}P) ATP y (^{32}P) ortofosfato.

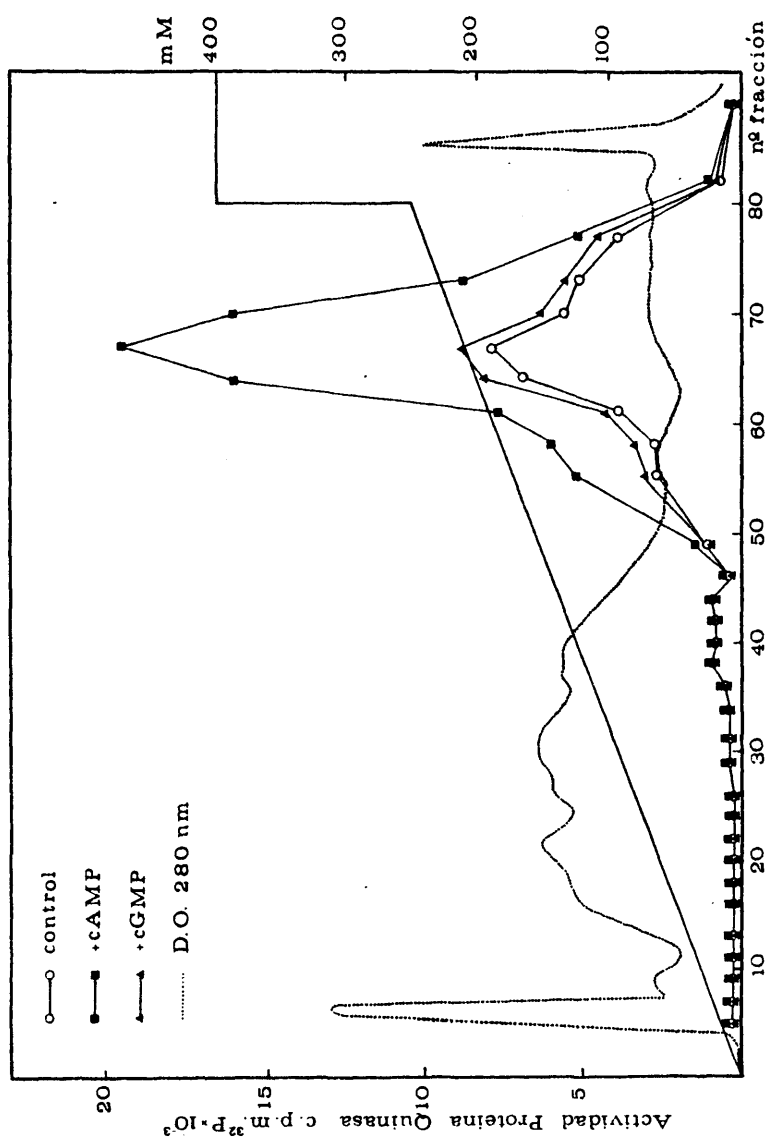


FIG. 12. Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxiapatito del preparado obtenido a partir de larva y sometido a tratamiento ácido y precipitación con sulfato amónico.

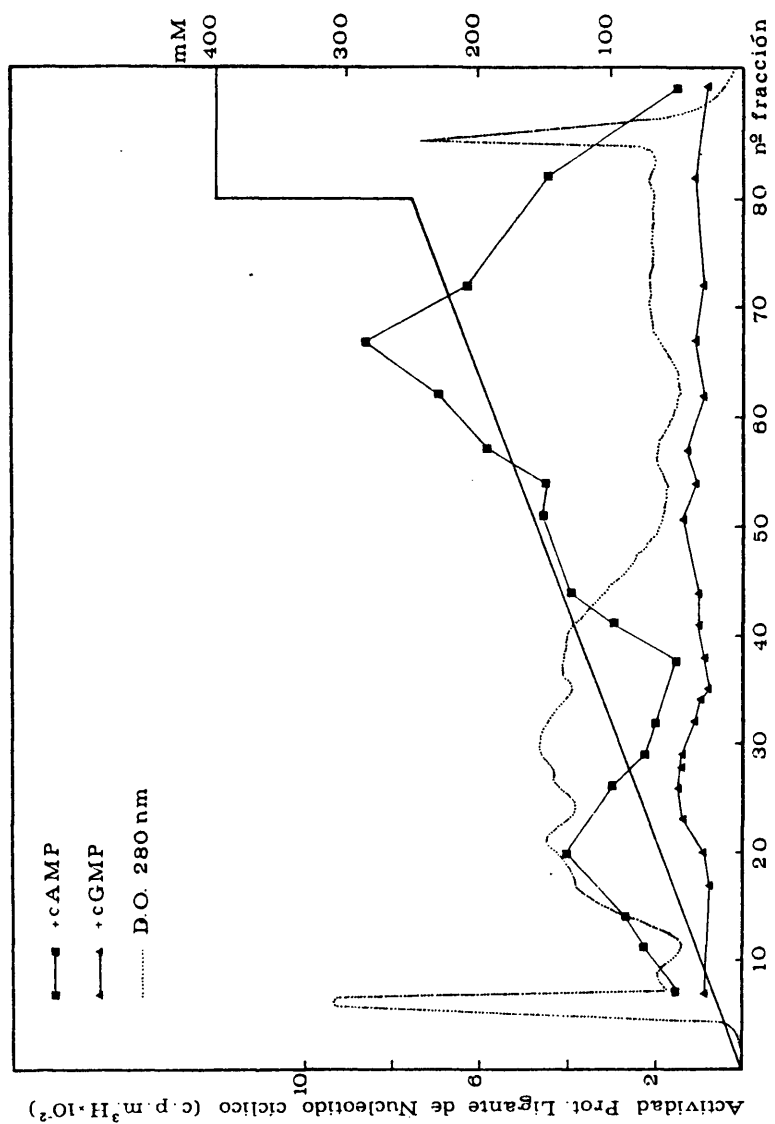


FIG. 13. Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxipatito del preparado obtenido a partir de larva y sometido a tratamiento ácido y precipitación con sulfato amónico.

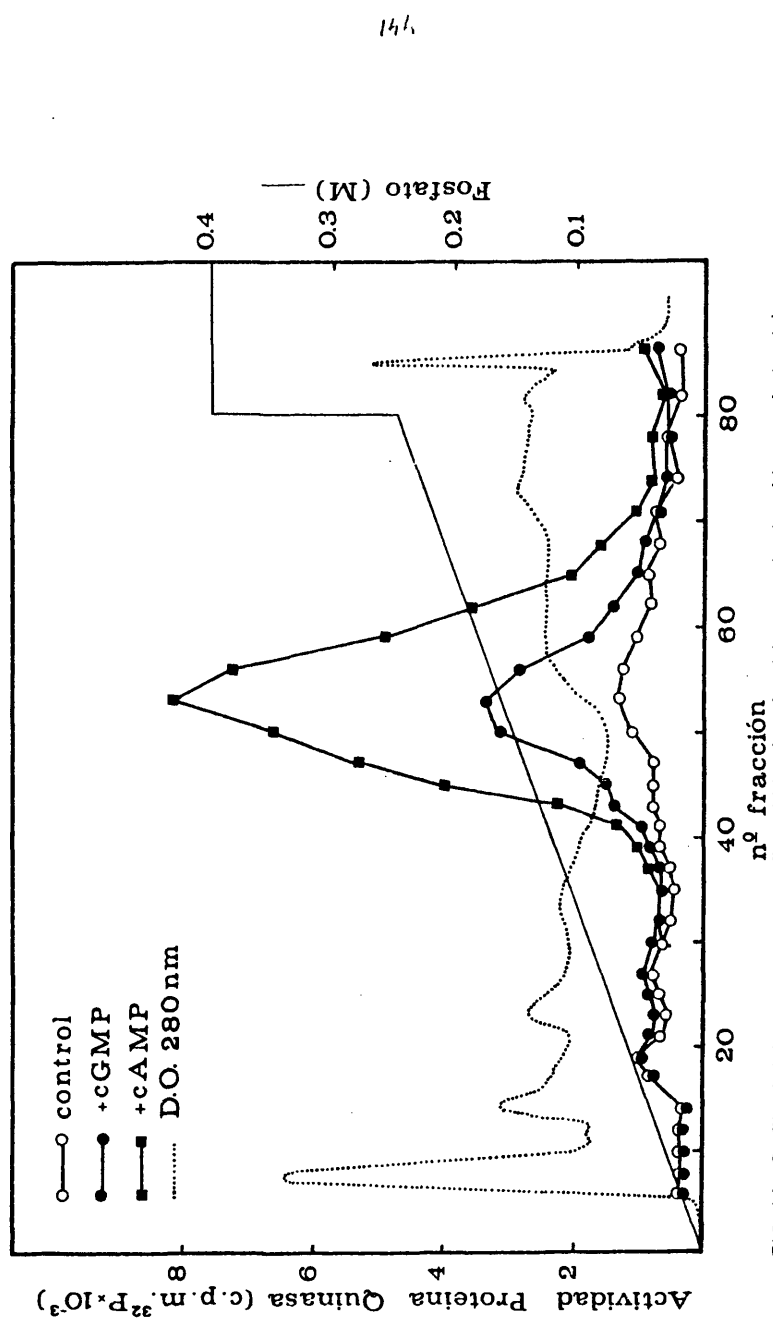


FIG. 14.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxiapatito del preparado obtenido a partir de adulto farato y sometido a tratamiento ácido y precipitación con sulfato amónico.

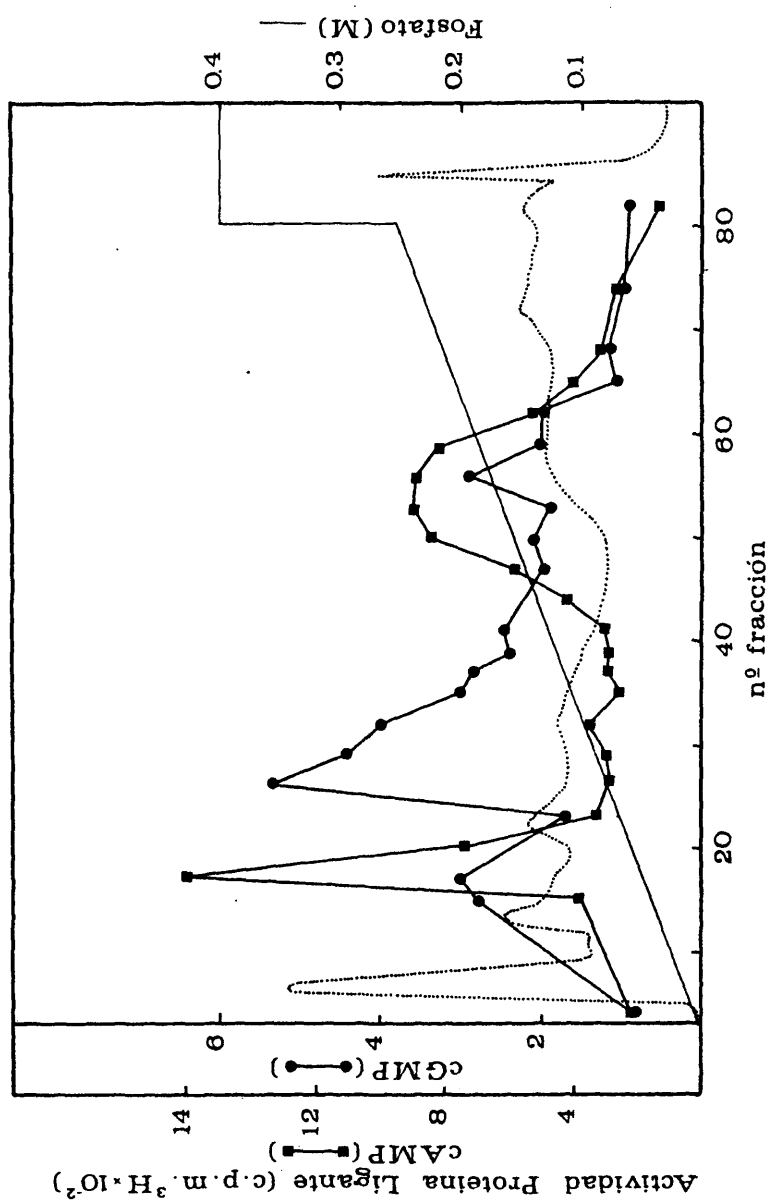


FIG. 15.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxiapatito del preparado obtenido a partir de adulto farato y sometido a tratamiento ácido y precipitación con sulfato amónico.

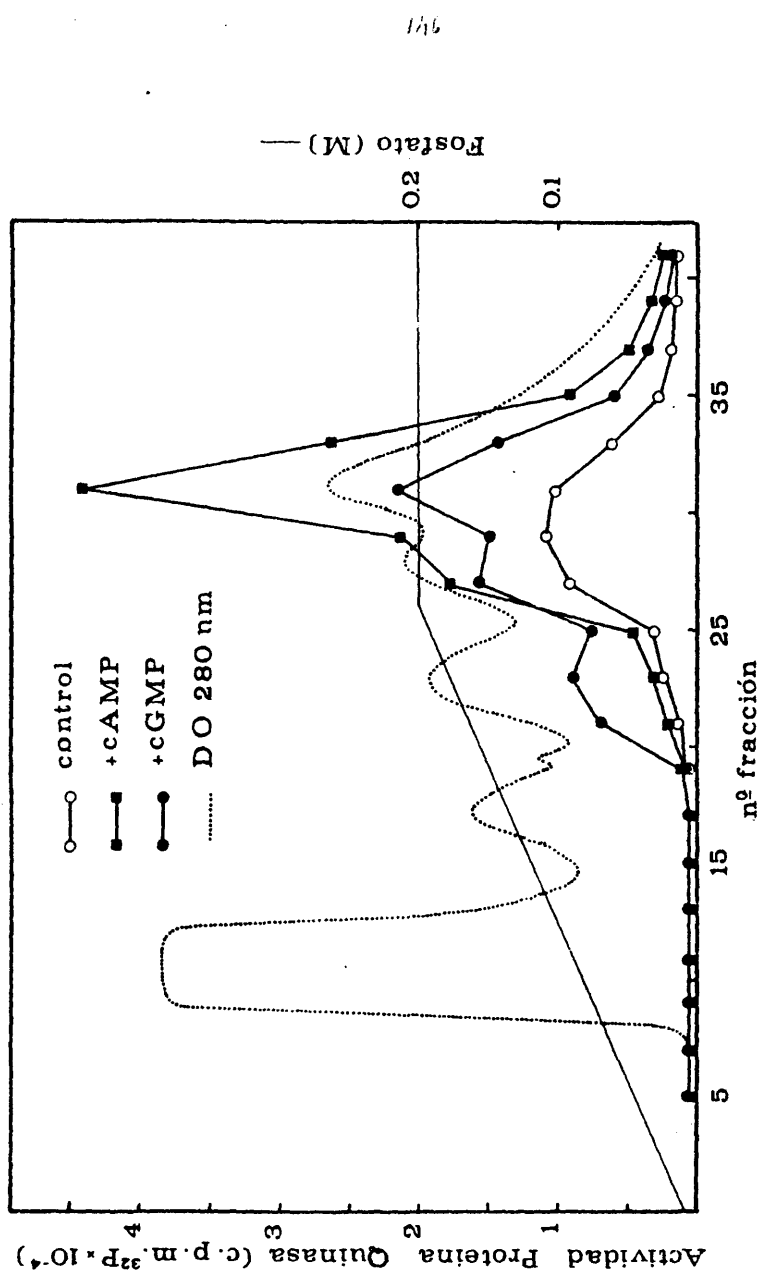


FIG. 16.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxipapato del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de cabezas de insecto adulto.

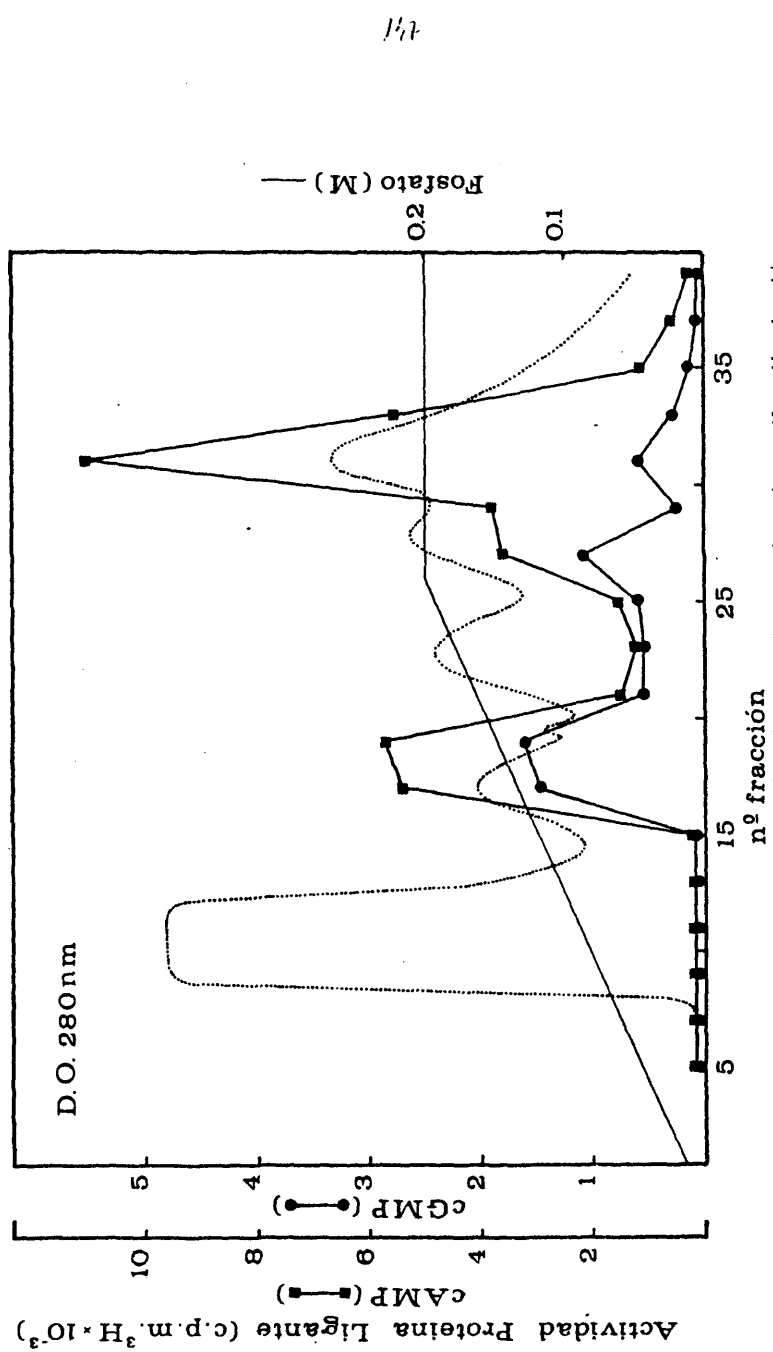


FIG. 17.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxipatito del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de cabezas de insecto adulto.

quinásica y ligante de nucleótidos cíclicos (ensayo tipo A) presentes en el eluido del preparado de larva y en las FIG 14 y 15/ las correspondientes al de adulto farato. En las FIG 16 y 17 se/ representan las actividades quinásica y ligante de nucleótidos/ cíclicos (ensayo tipo B), respectivamente, presentes en el eluido resultante de cromatografiar directamente en hidroxapatito - el sobrenadante de centrifugación, SC, obtenido a partir de cabezas de insecto adulto. De la comparación de los perfiles de actividad resultantes se pueden hacer las siguientes consideraciones:

1) Existe una actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP que parece desdoblarse en dos en la cromatografía del preparado de cabezas de insecto adulto (FIG 16 y 17), posiblemente debido a las peculiares condiciones en que ésta se lleva a cabo. Por otra parte, y teniendo en cuenta que los perfiles de las FIG. 12-15 se han obtenido en idénticas condiciones, el desplazamiento de los máximos de actividad indica la existencia de una - heterogeneidad en el sistema proteína quinasa a lo largo del desarrollo. Por un criterio similar, utilizando cromatografías de/ hidroxapatito, se ha determinado que las proteínas quinasas de - larva de cucaracha Periplaneta americana, no se corresponden con las proteínas quinasas del insecto adulto (300). En apoyo de esta posible heterogeneidad está el distinto comportamiento observado al cromatografiar en Sephadex G-200 las fracciones correspondientes a los máximos de actividad quinásica de los eluidos de las - cromatografías en hidroxapatito de los preparados de larva y - adulto farato (FIG 18 y FIG 19, respectivamente). Así, mientras/ que en el eluido del preparado de larva se aprecia un solo máximo de actividad quinásica (FIG 18); en el de adulto farato aparecen dos (FIG 19), el segundo de los cuales coincide con el de --

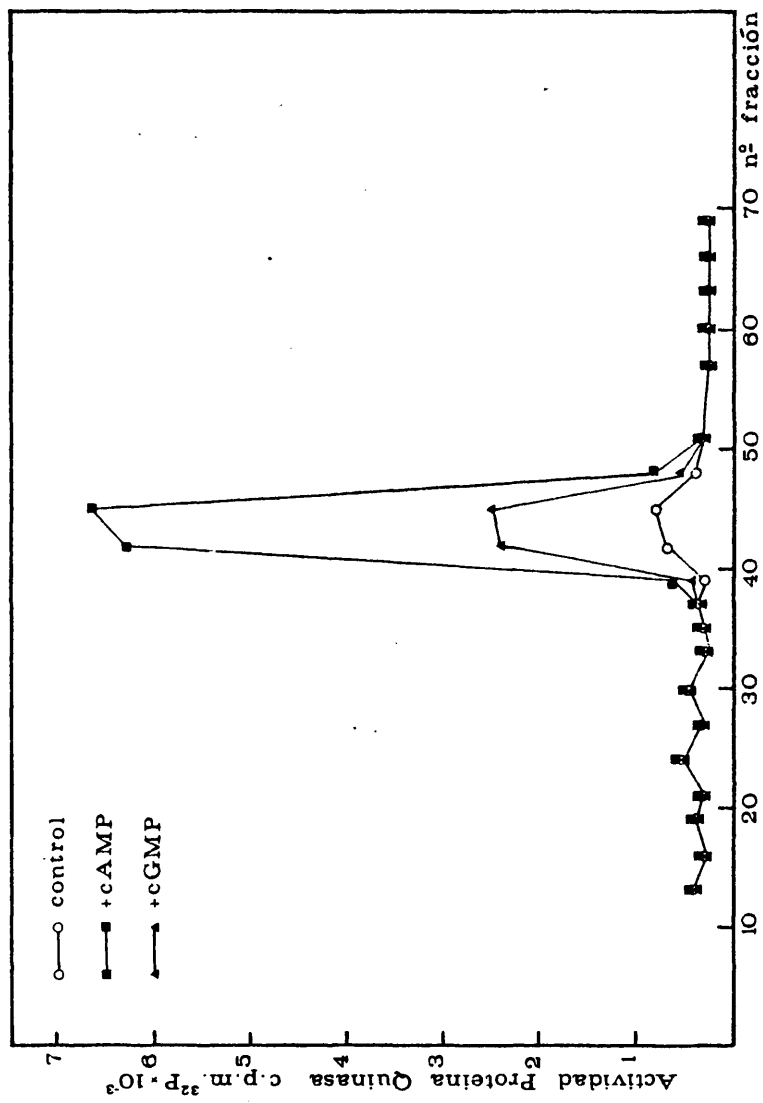


FIG. 18. Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-200 del preparado obtenido a partir de larva y previamente cromatografiado en hidroxipatito.

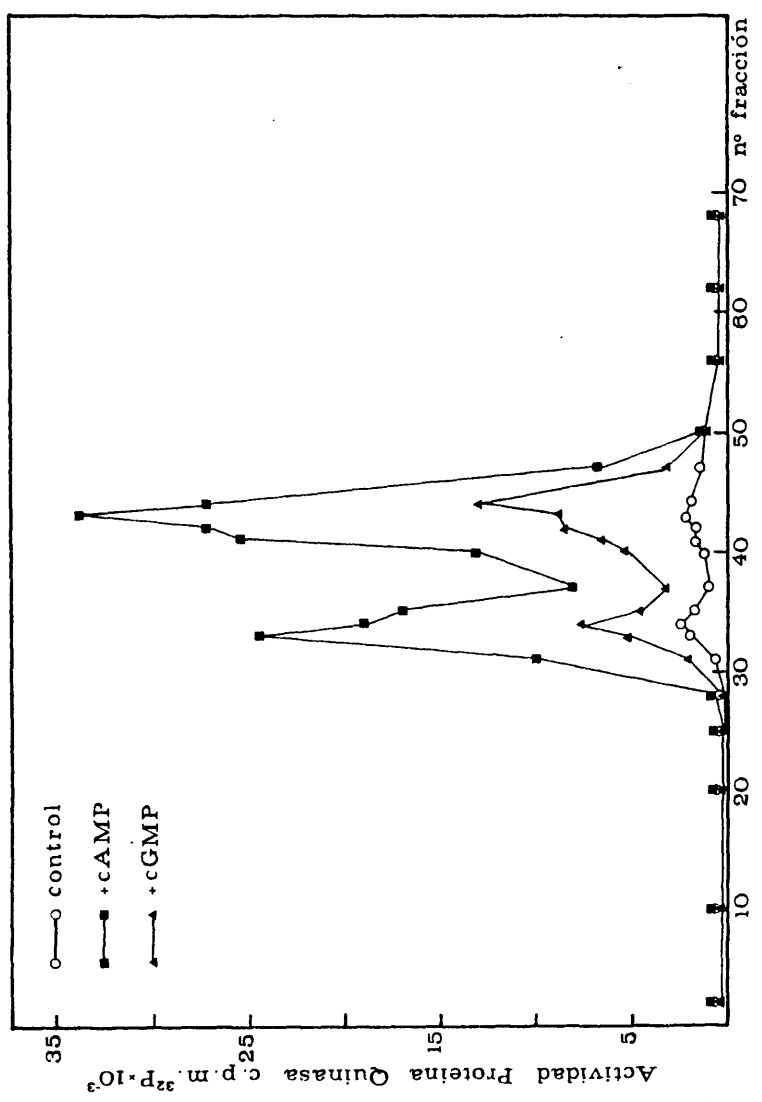


FIG.19.- Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-200 del preparado obtenido a partir de adulto farato y previamente te cromatografiado en hidroxipatito.

larva.

2) Existe una proteína quinasa dependiente de cGMP no detectable en larva, pero cuya actividad quinásica y ligante de cGMP son apreciables en cabeza de insecto adulto y adulto farato (FIG 16 y 15 respectivamente). La aparente falta de correlación entre ambas actividades de la enzima en los dos estados del desarrollo, se puede deber al distinto método utilizado para la medida de la unión de nucleótidos cíclicos y a los tratamientos previos a que ha sido sometido el preparado de adulto farato.

3) Aunque en estos experimentos la detención de la actividad quinásica dependiente de cGMP está desfavorecida por las condiciones del ensayo (10 mM de Mg^{2+}), se puede concluir que la actividad de PQA es mayoritaria sobre la de PQG, contrariamente a lo que ocurre con distintos tejidos y especies de lepidópteros (189) y coincidiendo con los datos disponibles de Drosophila melanogaster (189) y las cucarachas Blaberus discoidalis (189) y Periplaneta americana (300).

4) Existe una proteína ligante de cAMP (PL), que carece de actividad quinásica, detectable en los tres estados del desarrollo estudiados, aunque menos importante en larva. La relación de actividad ligante de cAMP entre PL y PQA es variable y puede llegar a invertirse la proporción de aproximadamente 1:2 - que se muestra en la FIG 17 (ver FIG 80).

3.2.2. Efecto del tratamiento ácido.

Cuando se somete a precipitación ácida, pH 4.9, los so

sobrenadantes de centrifugación (SC), se produce un aumento de la actividad de proteína quinasa total y específica que varía en -- función del material biológico de partida.

En la TABLA IV se muestra el efecto del tratamiento - ácido sobre preparados de adulto farato de 5 y 7 días. Mientras/ que con el primer material se consigue un aumento de 2-3 veces - en la actividad específica en presencia de cAMP, con el segundo/ el incremento es de aproximadamente 13 veces. Estos resultados - se interpretan como la eliminación de algún inhibidor, más abundante en el sobrenadante de centrifugación del adulto farato de/ 7 días.

El aumento de actividad tiene lugar en un intervalo -- muy amplio de pH (FIG 20), desapareciendo solamente cuando lo ha ce la propia actividad enzimática. El mínimo que se observa alre dedor de pH 4.8 se debe posiblemente a la proximidad del punto - isoelectrico de la enzima.

Aunque la precipitación ácida se ha utilizado en la pu rificación de las proteína quinasas de insectos (189,301 y 302), no se ha incluido en el esquema definitivo de purificación de -- las proteína quinasas dependientes de cAMP (apartado 3.3.1) por/ dos razones fundamentales. La primera debida a la observación de que el tratamiento ácido altera las características de retención de la enzima en DEAE-celulosa. La segunda debido a que la utili- zación consecutiva de la precipitación ácida y el tratamiento - con sulfato amónico (35-70% de saturación; ver apartado 3.3.1) - conduce a una pérdida de rendimiento sin que aumente sensiblemen ta la purificación, por lo que se ha optado por utilizar la se

TABLA IV

Efecto del tratamiento ácido sobre la actividad de proteína quinasa del sobrenadante de centrifugación

MATERIAL BIOLÓGICO	PREPARADO ENZIMÁTICO	Actividad de proteína quinasa					
		pmol ^{32}P / min-mg			%		
		Control	cAMP	cGMP	Control	cAMP	cGMP
Adulto farato de cinco días	SC1	10.6	63.9	19.0	100	100	100
	SH ⁺	29.4	158.2	82.1	277.4	247.6	432.1
Adulto farato de siete días	SC1	3.1	14.7	5.3	100	100	100
	SH ⁺	52.6	190.6	84.2	1696.8	1296.6	1588.7

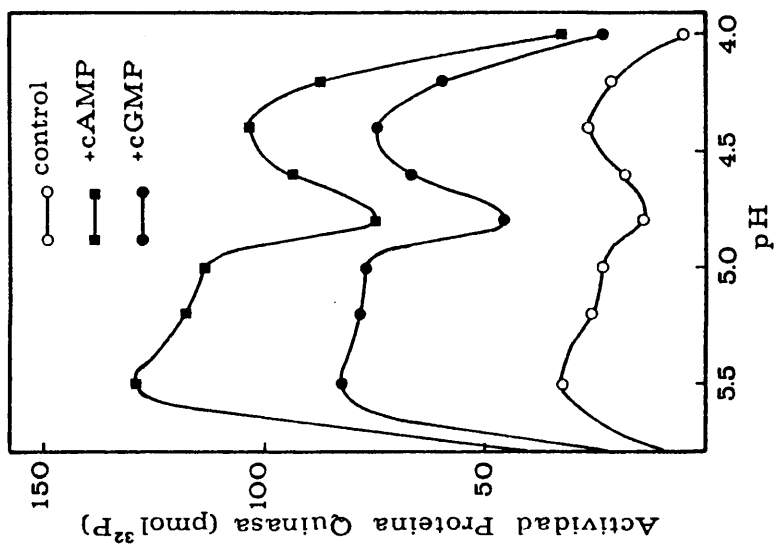


FIG.20.- Efecto del tratamiento ácido sobre la actividad de proteína quinasa del sobrenadante de centrifugación (adulto farato de 5 días).

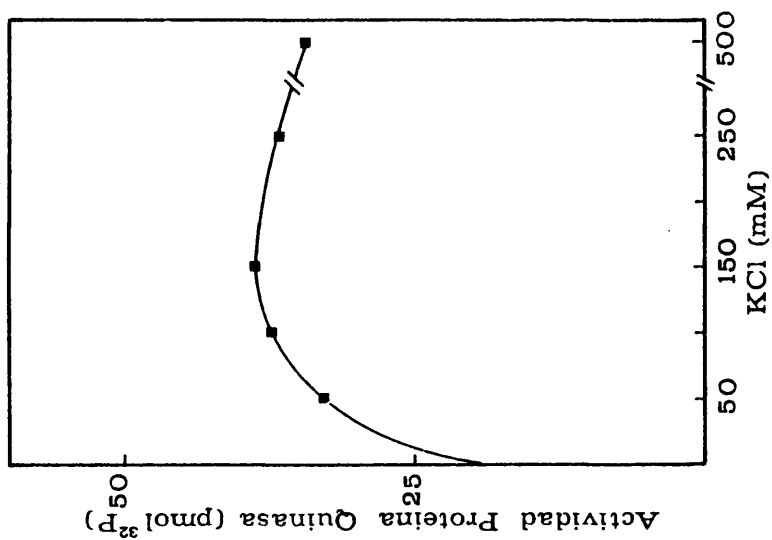


FIG.21.- Efecto de la fuerza iónica del tampón de homogenización sobre la actividad de proteína quinasa del sobrenadante de centrifugación (adulto farato de 5 días).

gunda precipitación que no presenta inconveniente adicional alguno.

3.3. Proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble.

3.3.1. Aislamiento y purificación.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el - ESQUEMA 1. Se ha descrito en homogeneizados de corazón la translocación artefactual de la subunidad catalítica de la proteína/quinasa dependiente de cAMP desde la fracción soluble a la partícula, lo que se puede evitar en presencia de concentraciones fisiológicas de KCl (150 mM) (149). En la FIG 21 se representa la recuperación de la actividad quinásica en fracción soluble en función de la fuerza iónica del tampón de homogeneización. Los resultados son muy similares a los obtenidos por Cherrington y col (335) con el máximo situado alrededor de 150 mM de KCl y con una importante recuperación de actividad (aproximadamente el 90%)

En la FIG 22 se representa la curva de solubilidad de la PQA, mayoritaria en el sobrenadante de centrifugación, en función de la fuerza iónica del medio (el ensayo de quinasa se realiza a dos concentraciones de Mg^{2+} con el fin de determinar la contribución de PQG). A la vista de los resultados obtenidos se precipita entre el 35-70% de saturación de sulfato amónico como primer paso de purificación, con unos rendimientos superiores al 100% (TABLA V) lo que se interpreta, como en el caso de la precipitación ácida, como la eliminación de algún inhibidor presente en el sobrenadante de centrifugación. Es probable que exista más de un factor de este tipo puesto que en los experimentos en los que se somete el preparado SS (35-70%) a una precipitación ácida a pH 4.9; aunque no se produce un aumento de la actividad total,

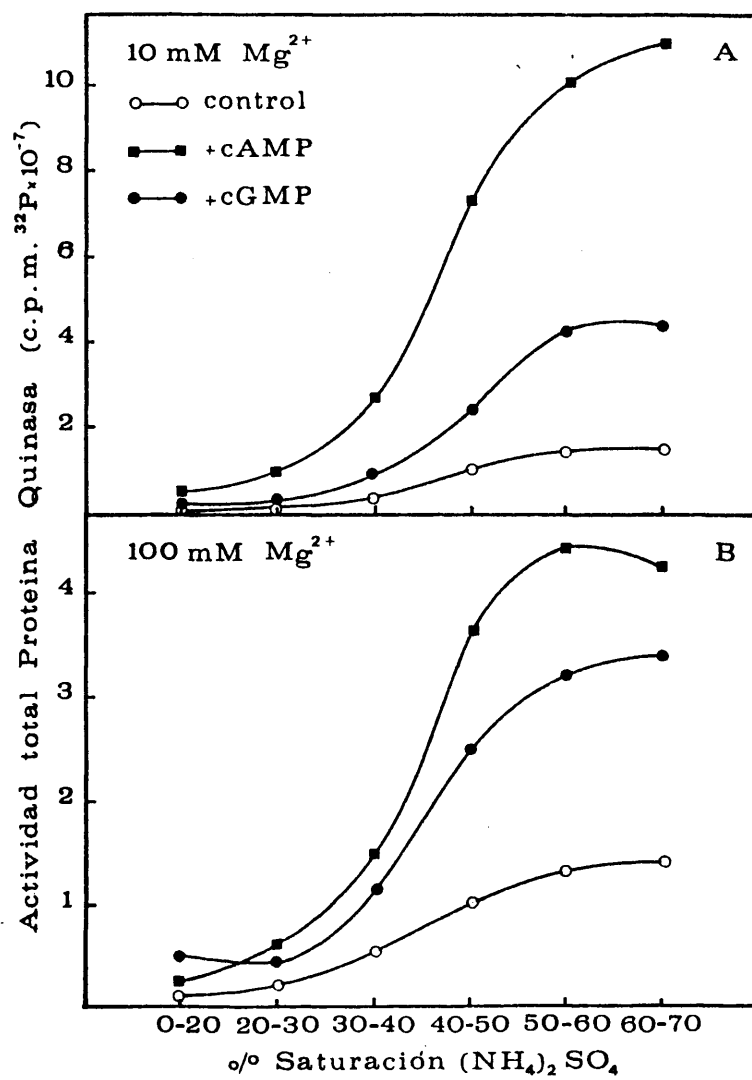


FIG.22.- Perfiles de las actividades de proteína quinasa precipitadas a distintos intervalos de saturación de sulfato amónico. Ensayo de actividad en presencia de 10mM de Mg^{2+} (A) y 100mM de Mg^{2+} (B).

es notable el incremento de la activación (dependencia de nucleotidos cíclicos de la enzima), debido a la disminución de la actividad basal. En las primeras publicaciones de proteína quinasa - de insectos (189,299,301 y 302) se describe la presencia en el sobrenadante de centrifugación de factores que interfieren en la detección de la actividad quinásica y en la activación por nucleotidos cíclicos, que son eliminados en parte por el tratamiento ácido y en mayor proporción por la precipitación con sulfato amónico (189,301 y 302) lo que conduce a rendimientos superiores al/100% (189).

En la FIG 23 se representa el perfil de actividad quinásica del eluido de Ultrogel AcA 44 (4 x 72 cm) cargado con el preparado SS. El máximo, próximo al volumen de exclusión, se encuentra dentro del intervalo de resolución del gel (10.000 -130.000). Disminuyendo la concentración de proteínas del preparado aplicado, se consigue minimizar la pérdida de rendimiento que supone la formación de agregados enzimáticos.

En la FIG 24 se muestra la actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en DEAE-celulosa las fracciones correspondientes al máximo de actividad quinásica del eluido de Ultrogel AcA 44. Aparecen dos picos de actividad de proteína quinasa dependientes de cAMP denominadas PQA-1 y PQA-2 en función de su orden correlativo de elución. Estos resultados confirman la supgerencia apuntada en la descripción de las experiencias preliminares acerca de la existencia de dos actividades quinásicas dependientes de cAMP, de lo cual hay precedente en insectos (300). La posible relación de ambas enzimas con los tipos I y II de mamíferos se discutirá posteriormente.

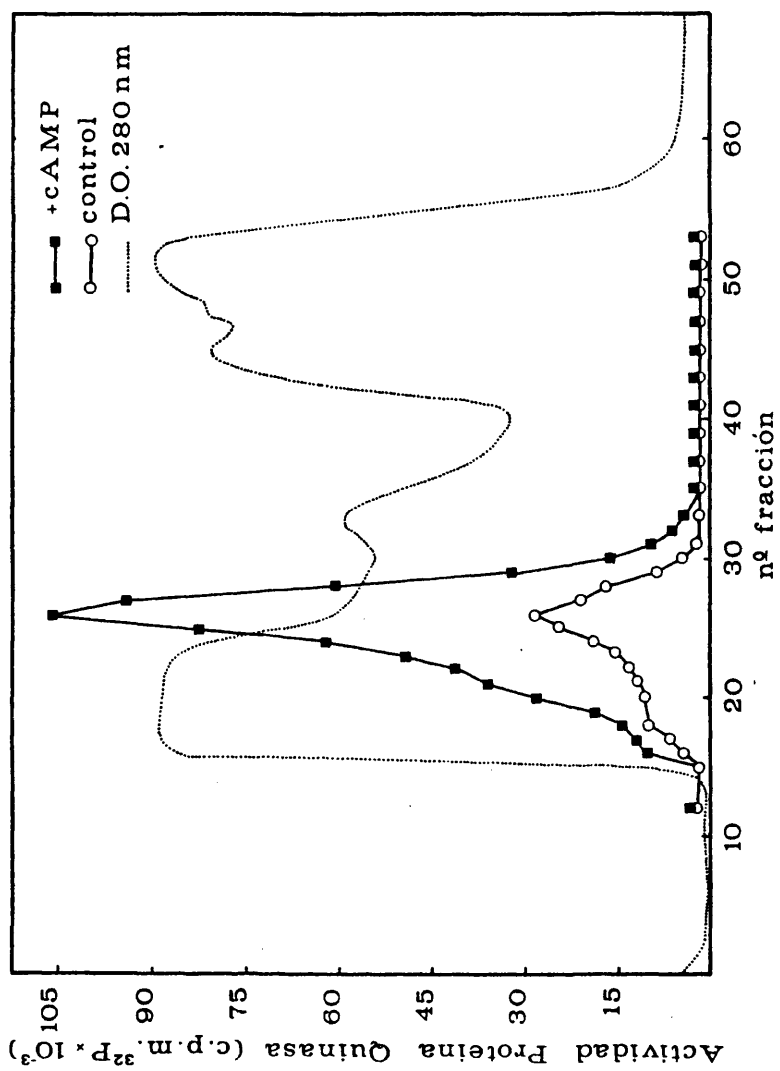


FIG.23.- Perfil del eluido de la cromatografía en Ultrogel AcA 44 del preparado SS (35-70 % de saturación de sulfato amónico).

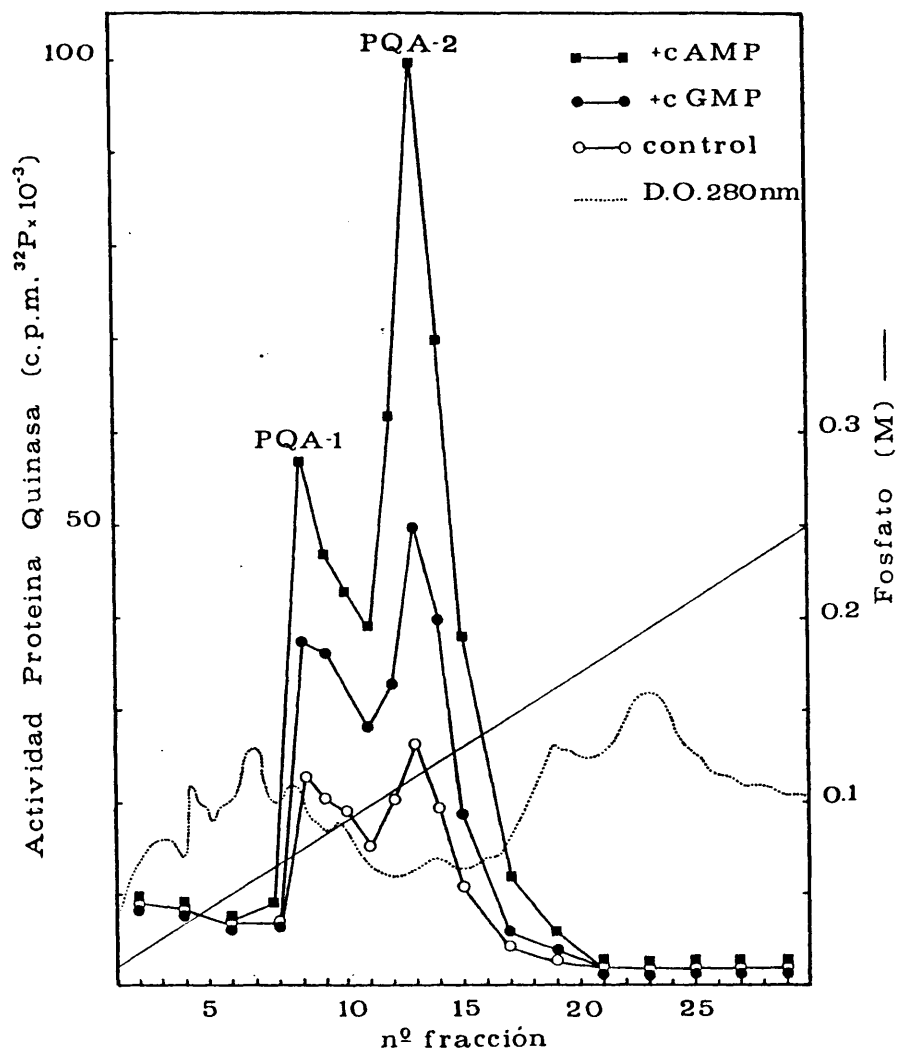


FIG. 24.- Resolución de las enzimas PQA-1 y PQA-2 en DEAE-celulosa.

En las FIG 25 y 26 se representan los perfiles de actividad quinásica obtenidos al cromatografiar separadamente en hidroxapatito las fracciones del eluido de DEAE-celulosa correspondientes a PQA-1 y PQA-2, respectivamente. La concentración de las fracciones correspondientes a los máximos de actividad quinásica de los eluidos de hidroxapatito se lleva a cabo dializando frente a polietilenglicol al 15% en tampón B. Aunque se puede conseguir una disminución de la duración de la diálisis utilizando concentraciones de polietilenglicol de hasta el 50%, siempre/que se sobrepasa el 20% se observa una turbidez en el preparado/que indica desnaturalización de la enzima lo que ocurre también/cuando se utiliza un sistema de ultrafiltración con Amicon. Hay que señalar, asimismo, la importancia de controlar la duración del proceso de concentración para evitar pérdidas de actividad de la enzima por desnaturalización.

Como último paso de purificación para PQA-2 se incluye a veces, una cromatografía en Sephadex G-200 del preparado enzimático obtenido al concentrar las fracciones con actividad de PQA-2 del eluido de hidroxapatito. El perfil de actividad obtenido es similar al de la FIG 19 con la proporción de ambos picos variable en función de la concentración previa a la cromatografía y de otros factores que se discutirán posteriormente (apartado 3.3.3)

En la TABLA V se muestran los valores de actividad quinásica obtenidos a lo largo del proceso de purificación que se encuentra resumido en el ESQUEMA 1.

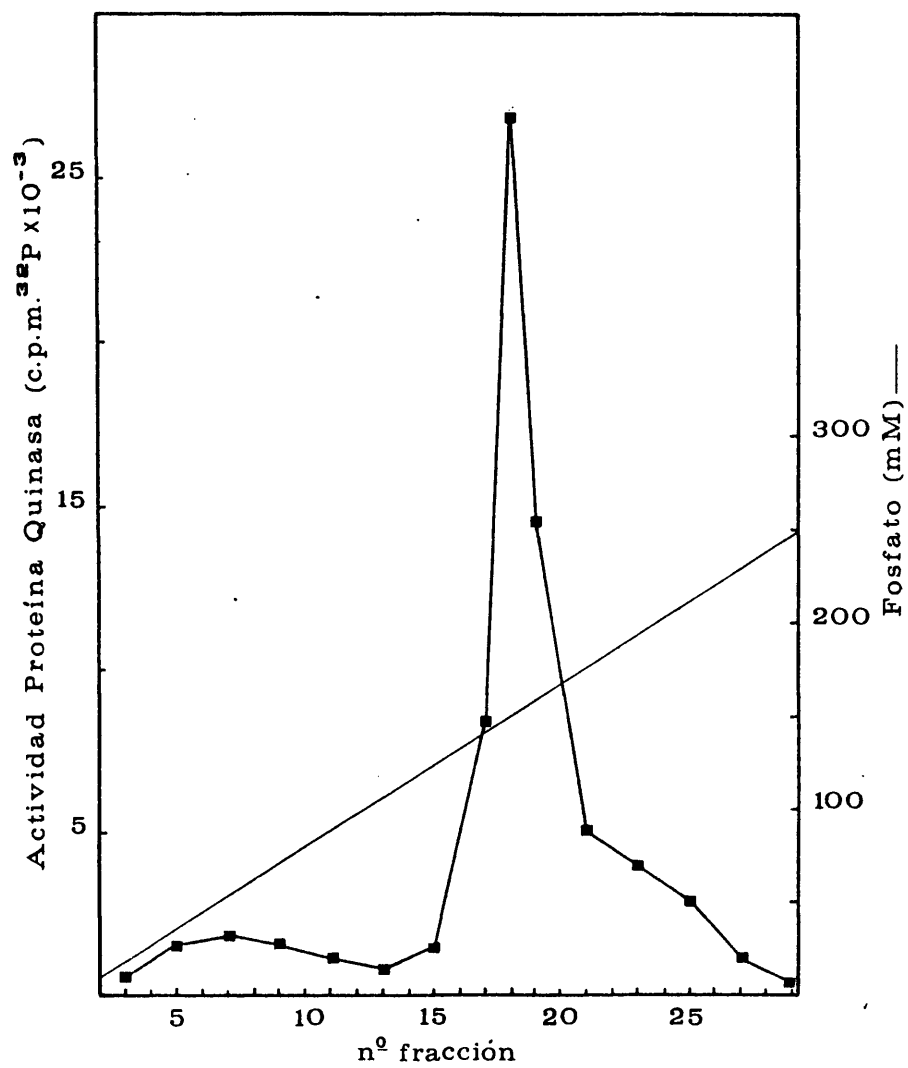


FIG. 25.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxapatito de la enzima PQA-1 (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

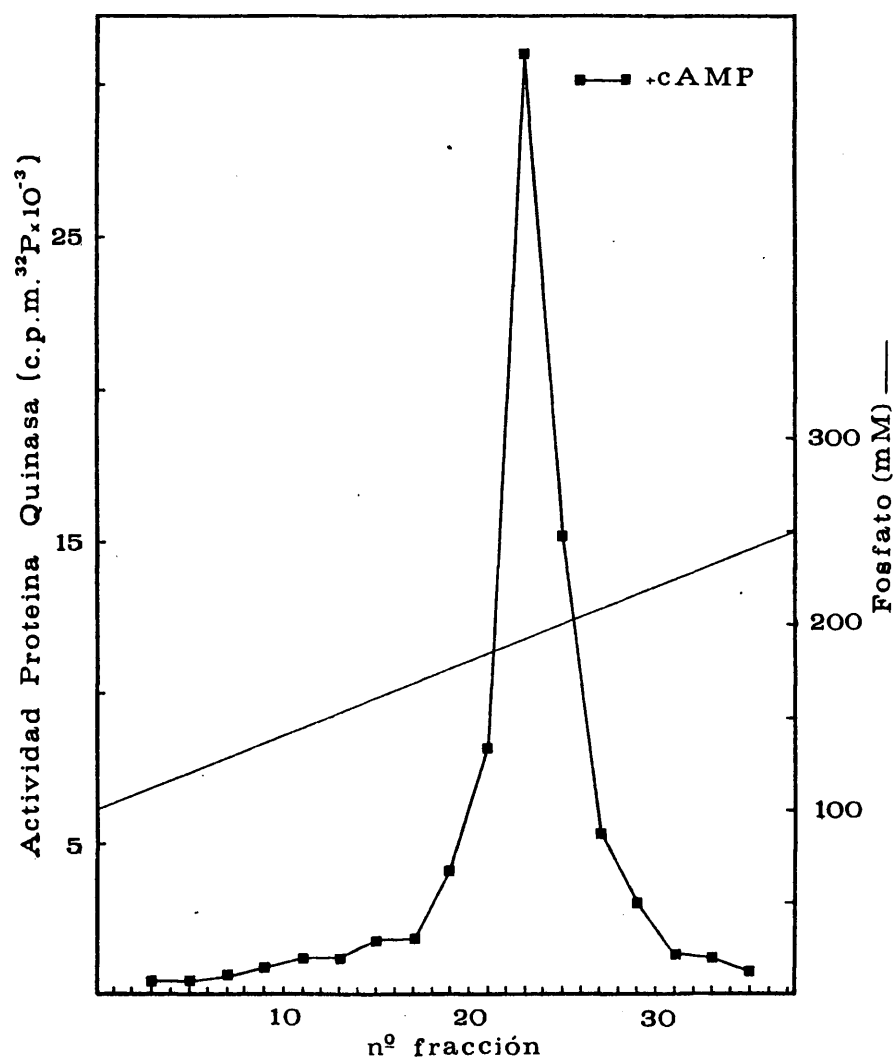


FIG. 26.- Perfil del aluido de la cromatografía en hidroxiapatito de la enzima PQA-2 (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

TABLA V

Purificación de POA-2

MUESTRA	Prot. total (mg)	Nucleótido cíclico	c.p.m. 32 P	Act. específica	Purific.	Act. total $\times 10^{-5}$	Rendimiento (%)
Sobrenadante de centríf. (SC1)	3450	—	2521	44.6	1.0	1.54	100.0
		cAMP	7748	137.1	1.0	4.73	100.0
Preparado SS (35-70 %)	1441	—	17076	310.7	7.0	4.48	290.9
		cAMP	59288	1078.9	79.0	15.55	328.7
Ultrogel AcA 44	206	—	25017	2276.3	51.0	4.69	304.5
		cAMP	82328	7491.2	54.6	15.43	326.2
DEAE-celulosa	31	—	10705	974.1	21.8	0.30	19.5
		cAMP	145776	13264.0	96.7	4.11	86.9
Biogel HTP	2.3	—	8647	4589.7	102.9	0.10	6.9
		cAMP	182084	96647.6	705.0	2.22	46.9

Actividad específica: pmol 32 P / mg prot. / 5 min / 0.2 mg histonaActividad total: pmol 32 P / 5 min / 0.2 mg histona

3.3.2. Conservación.

Los preparados de PQA-1 y PQA-2, sobre todo los obtenidos en la última etapa del proceso de purificación, son muy sensibles a la congelación, independientemente de la temperatura con la que ésta se lleve a cabo, teniendo lugar una pérdida prácticamente total de la actividad enzimática. Este comportamiento supone, obviamente, una grandificultad para el estudio y caracterización de las enzimas. Por el contrario, la estabilidad de la enzima en baño de hielo o cámara fría es bastante prolongada, pudiéndose conservar de esta forma los preparados altamente purificados durante ocho o diez días sin una gran pérdida de actividad.

Cuando la conservación se efectúa a -20°C con una concentración de glicerol entre 45-50%, que es la que se requiere para que el preparado no se congele a esa temperatura, no se pierde actividad con el descenso de la misma pero se produce una interferencia en el ensayo que reduce en aproximadamente un 50% la actividad enzimática.

La estabilización con albúmina se ha utilizado en la conservación de proteína quinasas solubles (216) y de membrana (336). En las FIG 27A y 27B se muestra el efecto protector frente a la congelación de concentraciones crecientes de albúmina en preparados altamente purificados de PQA-1 (140 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y PQA-2 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectivamente. Se observa que la pérdida de actividad es menor a medida que aumenta la concentración de proteína, aunque no existe una relación directa entre la cantidad de albúmina que es necesario añadir para preservar la actividad y la concentración proteica del preparado original.

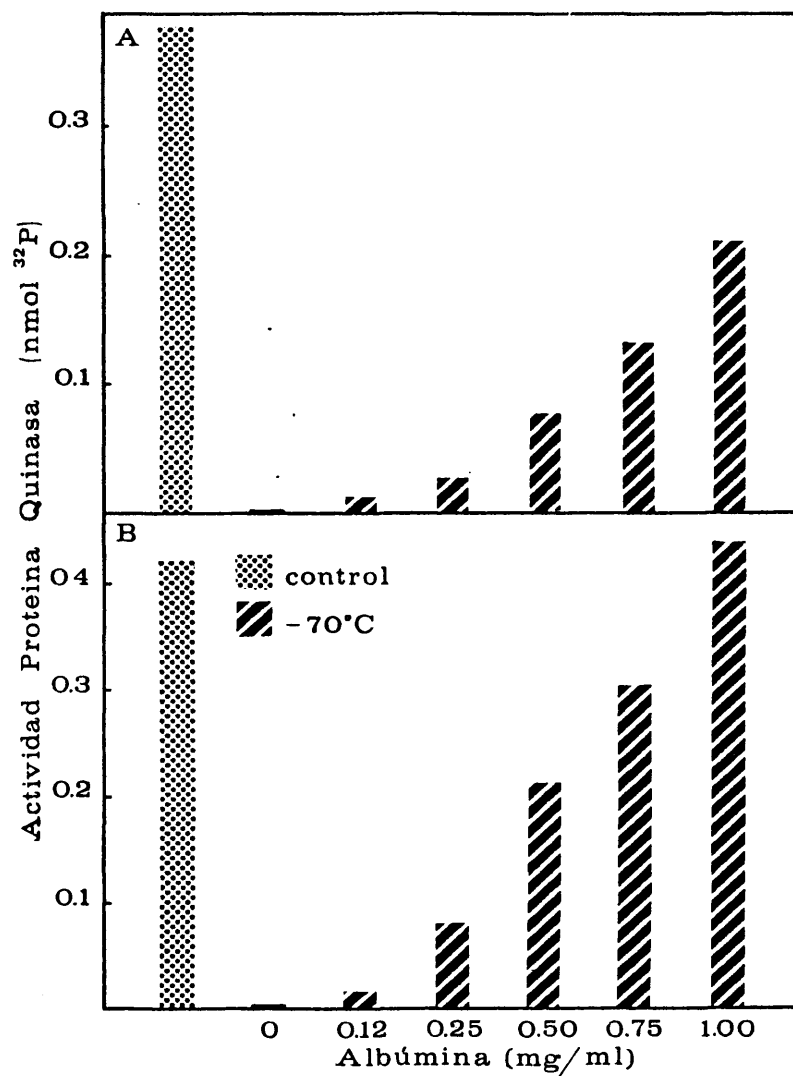


FIG.27.- Efecto de la concentración de albúmina en la conservación de los preparados enzimáticos de PQA-1 (A) y PQA-2 congelados a -70°C (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

A excepción de la proteína ligante de cAMP que no precisa de agentes estabilizadores, todas las demás proteínas solubles aquí estudiadas tienen un comportamiento similar a PQA-1 y PQA-2 en lo que respecta a su conservación.

3.3.3. Estudio del equilibrio de agregación.

3.3.3.1. Influencia del tiempo.

En la FIG 28 se muestra el efecto del tiempo sobre la agregación del sistema PQA. En la FIG 28A se encuentra el perfil de actividad correspondiente a la cromatografía en Ultrogel Aca 44 del preparado SS recién obtenido, en la FIG 28B la de este mismo preparado a las 24 horas y en la FIG 28C su cromatografía a las 48 horas en Sephadex G-100. Con el cambio de gel en la última cromatografía se pretende comprobar que el desdoblamiento de la actividad enzimática no es debido a algún tipo de retención anómala por parte del Ultrogel Aca 44.

De los resultados obtenidos se concluye que tiene lugar una agregación del sistema PQA, mayoritariamente presente en el preparado SS, que viene favorecida por el transcurso del tiempo. El primer pico de actividad de las FIG 28B y 28C coincide con el volumen de exclusión y en el mismo podrían estar incluidos varios agregados de distinto tamaño molecular.

3.3.3.2. Influencia de la fuerza iónica.

En la FIG 29 se representa el perfil de actividad quinásica obtenido al cromatografiar en Ultrogel Aca 44 (4 x 72 cm) -

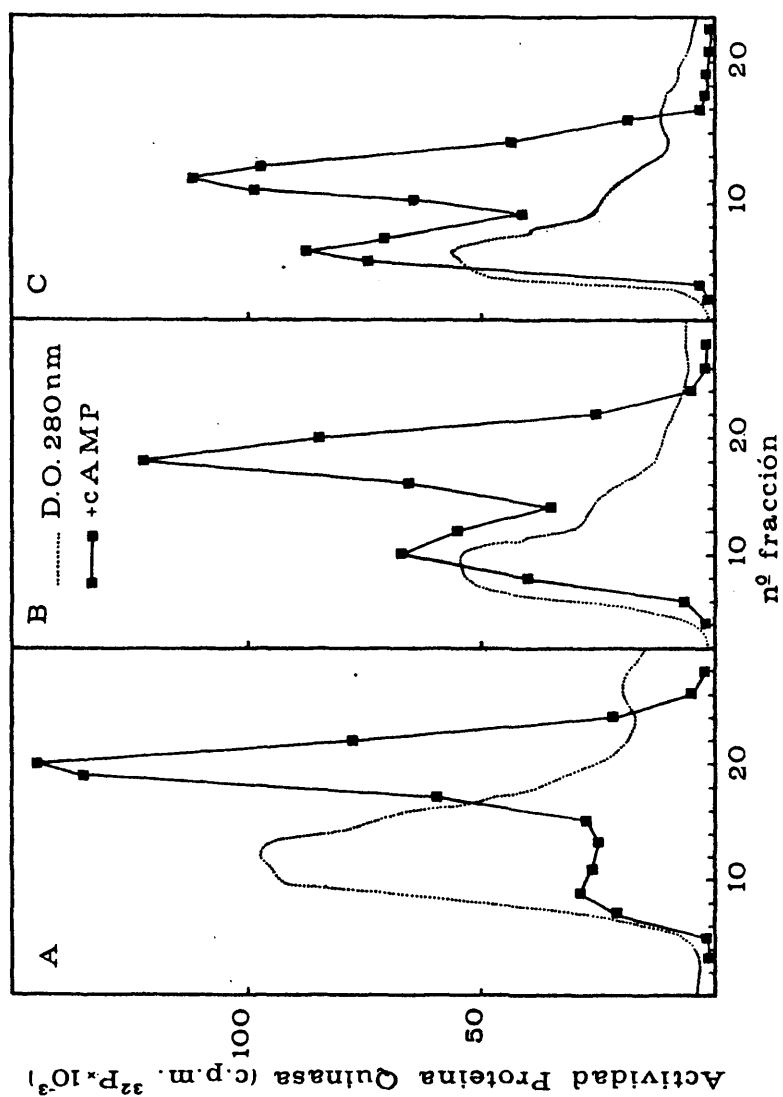


FIG. 28.- Efecto del tiempo sobre la agregación de las proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble. A y B corresponden a los perfiles de los eluidos de las cromatografías en Ultragel AcA 44 de un preparado SS(35-70 % de saturación de sulfato amónico) aplicada inmediatamente después y a las 24 h de su obtención, respectivamente, y C al perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-100 de este mismo preparado a las 48 h de su obtención.

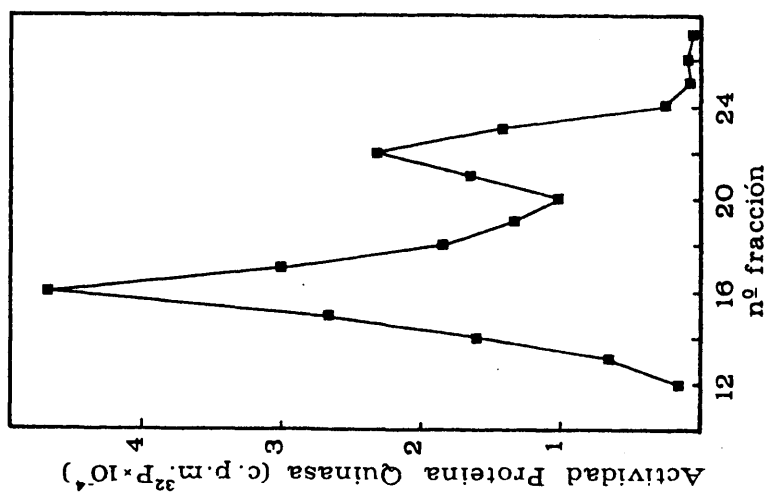


FIG. 29: Perfil del eluido de la cromatografía en Ultratgel AcA 44, con tampón B, del preparado SS (35-70 % de saturación de sulfato amónico) a las 48 horas de su obtención (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

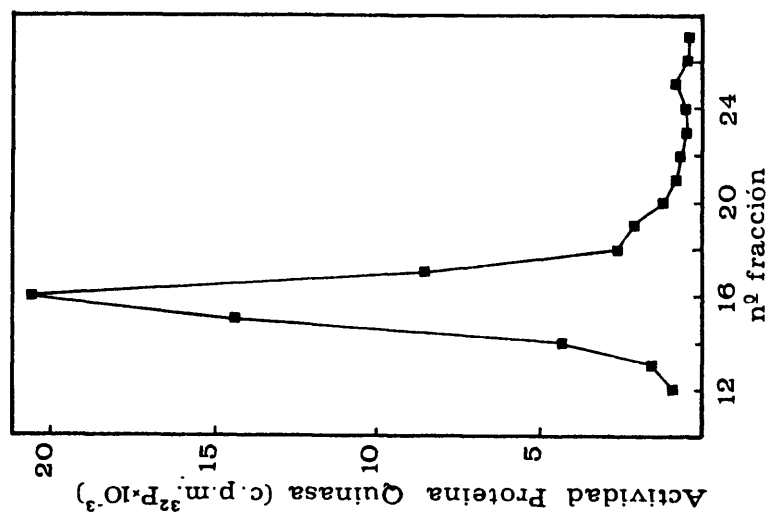


FIG. 30: Perfil del eluido de la cromatografía en Ultratgel AcA 44, con tampón B conteniendo 150 mM de KCl, de la fracción 16 correspondiente al eluido cuyo perfil se representa en la FIG. 29 (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

un preparado SS obtenido de adulto farato. Cuando se recromatografía en las mismas condiciones la fracción 16, correspondiente al máximo de actividad del agregado, pero incluyendo en el tampón de equilibrio y de elución una concentración 150 mM de KCl, se obtiene el perfil que se muestra en la FIG 30.

Se puede concluir que una vez formado el agregado, el equilibrio no se revierte, ni siquiera de forma parcial, al aumentar la fuerza iónica, lo que parece indicar que el proceso de agregación no tiene lugar, mediante interacciones iónicas. Estos resultados son lógicos habida cuenta que la agregación en función del tiempo representada en la FIG 28 se da en un preparado SS sin dializar, en el que existe una considerable concentración salina.

3.3.3.3. Influencia de la concentración de proteínas.

En las FIG 31 y 32 se muestran los perfiles de actividad quinásica resultantes de cromatografiar directamente en Ultrogel/AcA 44 los sobrenadantes de centrifugación obtenidos de adulto farato de 5 días e insecto adulto recién emergido, respectivamente. La elución se lleva a cabo en presencia (FIG 31A y 32A) o en ausencia (FIG 31B y 32B) de KCl (150 mM). La aparición de un único máximo de actividad en las cuatro cromatografías (aunque se insinúa un pequeño pico en el volumen de exclusión), viene a indicar que la agregación anteriormente señalada se produce artefactualmente, posiblemente favorecida por la elevada concentración de proteínas en el preparado SS, y que la enzima se encontraría fisiológicamente en forma no agregada.

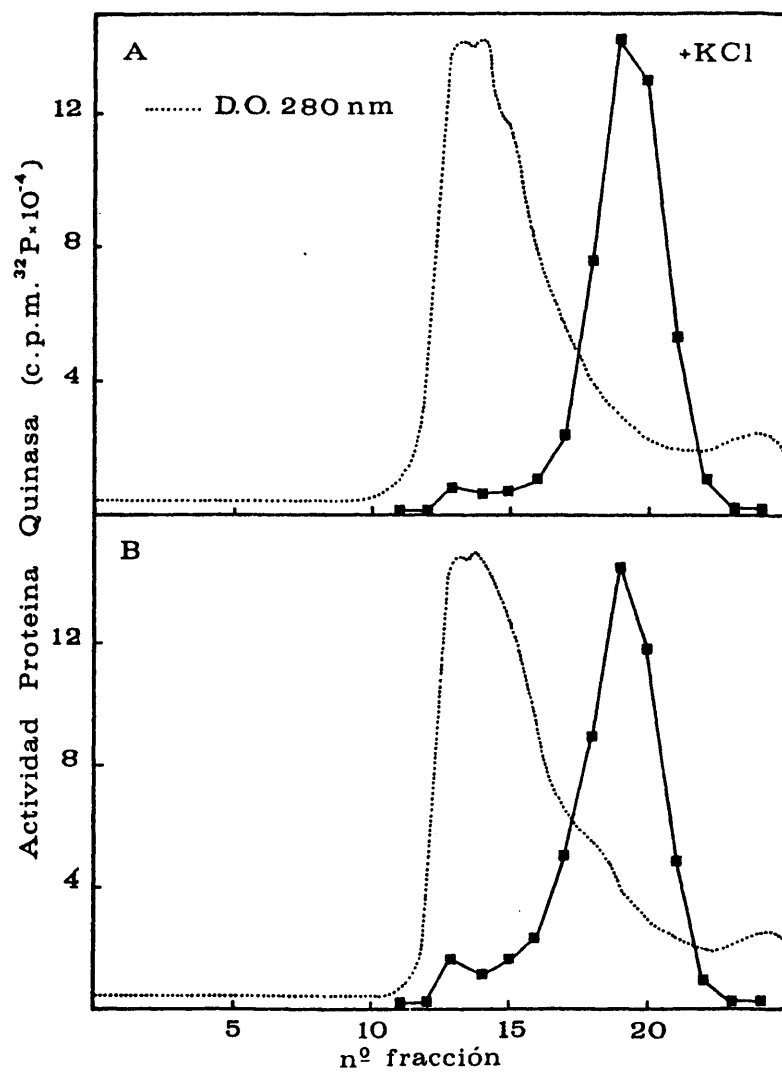


FIG.31.- Perfiles de los eluidos de las cromatografías en Ultrogel AcA 44 del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de adulto farato. (A) Elución con tampón B conteniendo 150 mM de KCl. (B) Elución con tampón B. El ensayo de actividad se realiza en presencia de cAMP.

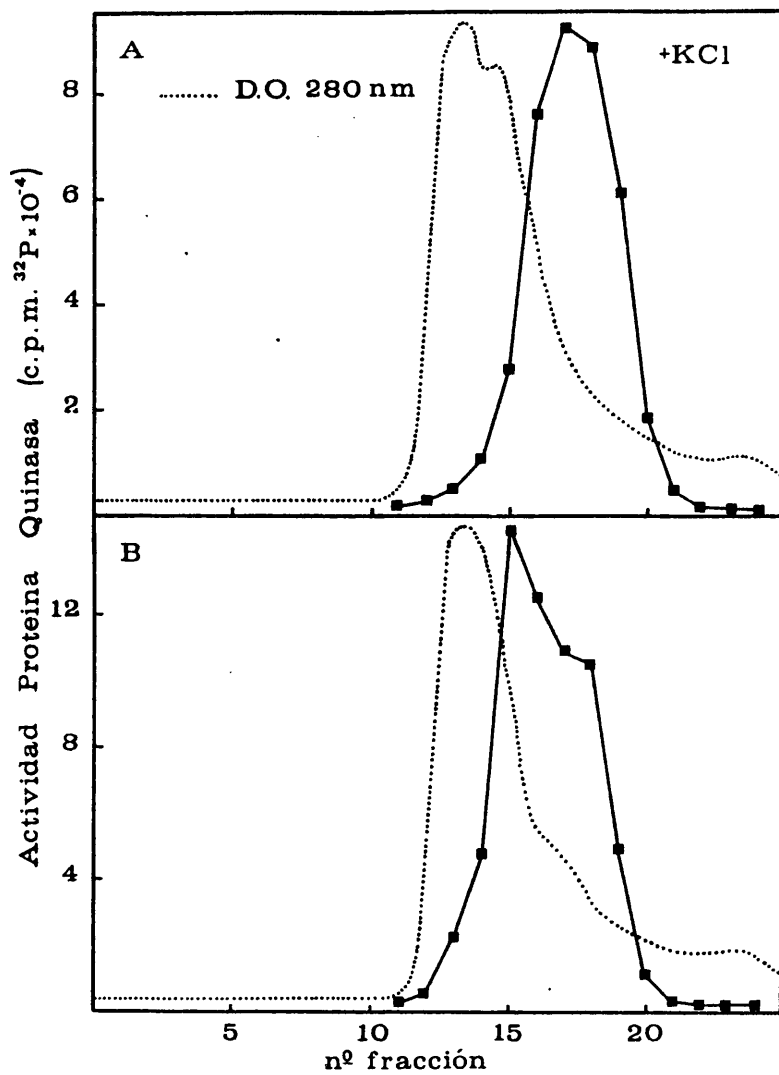


FIG.32.- Perfiles de los eluidos de las cromatografías en Ultrogel AcA44 del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de insecto adulto. (A) Elución con tampón B conteniendo 150 mM de KCl. (B) Elución con tampón B. El ensayo de actividad se realiza en presencia de cAMP.

El proceso de agregación podría tener lugar a través de la formación de puentes disulfuro, cuyo papel relevante en el mantenimiento de la estructura de la holoenzima ha sido ampliamente descrito. Otra posible interpretación es que la enzima fisiológicamente activa corresponda a la forma agregada y que la disociación tuviera lugar como consecuencia de la presencia de productos tiólicos en el tampón de homogeneización y etapas sucesivas, lo que supondría una estructura excepcional para el sistema PQA del insecto. Por último, es posible que ambas formas presenten diferentes características cinéticas y que el equilibrio de agregación tenga significación fisiológica.

La anchura de los picos correspondientes a los eluidos del preparado de insecto adulto (FIG 32A y 32B) viene a indicar una cierta heterogeneidad en la forma no agregada del sistema PQA como ya se ha apuntado en los experimentos preliminares. Otros autores han señalado un comportamiento similar de la isoenzima tipo II de PQA en DEAE-celulosa y QAE-Sephadex (40 y 46).

La comparación de los perfiles de actividad de las FIG 18 y 19 correspondientes a cromatografías en Sephadex G-200 en idénticas condiciones de preparados de larva y adulto farato, respectivamente, sugiere que el sistema PQA puede exhibir distinto comportamiento, en cuanto a la agregación se refiere, a lo largo del desarrollo.

3.3.4. Pesos moleculares

La FIG 33 corresponde a una representación semilogarítmica de calibrado para proteínas de diferentes tamaños moleculares.

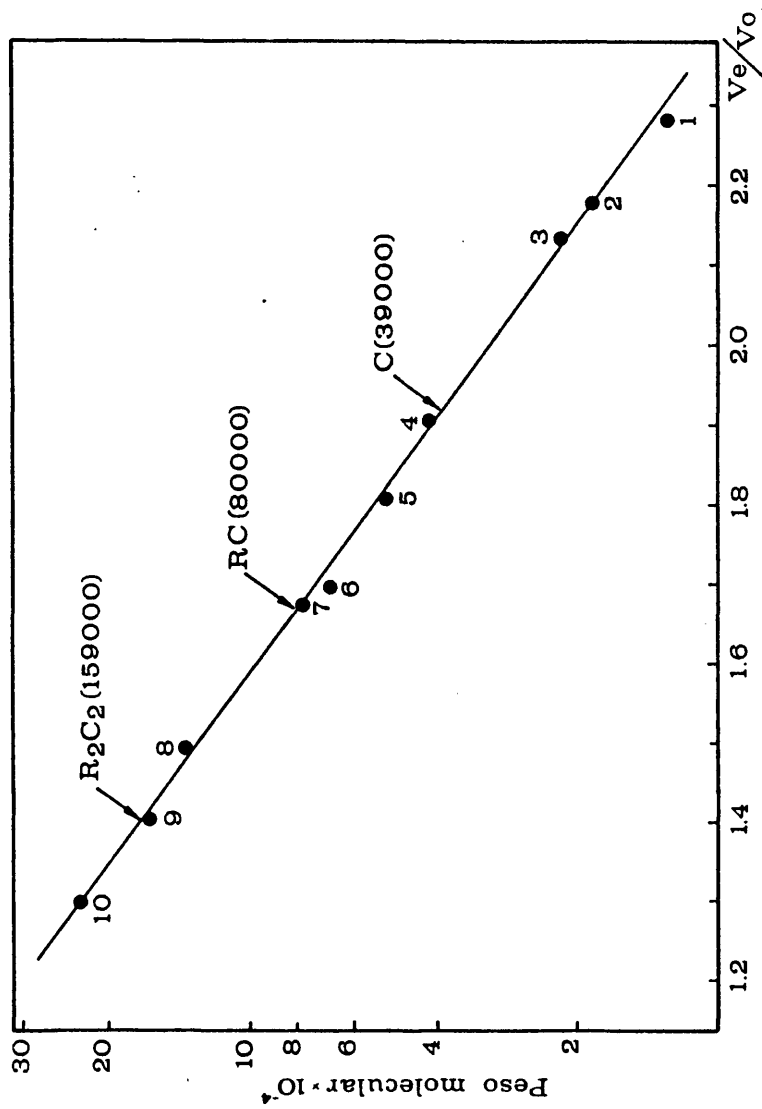


FIG.33. Representación semilogarítmica de calibrado para proteínas de diferentes tamaños moleculares en Sephadex G-200. Los números corresponden a las proteínas indicadas en el texto y las flechas a las dos formas de la holoenzima y a la subunidad catalítica de la enzima PQA-2.

res en Sephadex G-200. Los números corresponden a las proteínas/ indicadas en el apartado 2.5.4. El ensayo de actividad quinásica del eluido en ausencia de cAMP en las condiciones cromatográfi--cas señaladas muestra la existencia de dos máximos de actividad/ a cuyos volúmenes de elución les corresponden pesos moleculares/ de aproximadamente 159.000 y 80.000D, este último coincidiendo - con el de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo. El elui- do en presencia de cAMP presenta un único pico de actividad a cu- yo volumen de elución le corresponde un peso molecular aproxima- do de 39.000D.

Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos al estudiar el equilibrio de agregación se puede concluir que la pro- teína quinasa dependiente de cAMP, PQA-2, existe mayoritariamen- te en forma dimérica RC, de peso molecular 80.000D, con ambas - subunidades de tamaño similar (aproximadamente 40.000D) y que en determinadas condiciones se puede formar el agregado R_2C_2 , de -- 160.000D, resultanto enzimáticamente activas tanto una como -- otra forma. Como en DEAE-celulosa se cromatografía la de peso mo- lecular 80.000 D, en principio, la aparición de dos actividades/ dependientes de cAMP no sería atribuible a la agregación y es po- sible que PQA-1 tenga características estructurales muy simila-- res a PQA-2. Otras proteína quinasas dependientes de cAMP de es- tructura dimérica son la del díptero *Drosophila melanogaster* (49), la de levadura (59) y la asociada a membranas de cerebro bovino. (60).

3.3.5. Caracterización enzimática.

Los preparados enzimáticos utilizados se han purifica- do hasta la etapa de Biogel HTP, y para PQA-2, a veces, hasta la

de Sephadex G-200 (ESQUEMA 1) en cuyo caso se ensaya con la forma no agregada.

3.3.5.1. Efecto de cationes divalentes.

En la TABLA VI se muestra la actividad enzimática de PQA-2 en presencia de distintos cationes divalentes. La enzima tiene un requerimiento absoluto de catión divalente y en su ausencia únicamente exhibe una ligera actividad. El catión que mejor satisface estos requerimientos es el Mg^{2+} y en menor proporción el Co^{2+} , como se ha descrito para otras proteína quinasas dependientes de cAMP de insectos (189, 299 y 300). El Co^{2+} estimula las proteína quinasas dependientes de cAMP de varios tejidos/ de mamíferos en mayor extensión que el Mg^{2+} (117). El Mn^{2+} contrariamente a lo que ocurre con la PQA de pupa de Bombyx mori (161) no puede sustituir al Mg^{2+} en su papel activador disminuyendo incluso los niveles basales de actividad en ausencia del catión divalente con un efecto similar, aunque menos acentuado, que el Zn^{2+} , Cu^{2+} o Ca^{2+} .

En la FIG 34 se representa la inhibición de la actividad de la enzima PQA-2 por cationes divalentes (el ensayo de actividad se realiza en presencia de 10 mM de Mg^{2+}). En concordancia con los datos de la TABLA VI, Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} , son, por este orden, los mejores inhibidores de la actividad de la enzima./ En este sentido, se ha comprobado que el Co^{2+} 10 mM es un potente inhibidor para las PQA de insectos, pero no para las PQA de mamíferos (189).

En las FIG 35A y 35B se muestra el efecto de la concen

tración de Mg^{2+} sobre la actividad de PQA-1 y PQA-2, respectivamente. La respuesta de PQA-1 a la concentración de Mg^{2+} es típica de los sistemas dependientes de cAMP, con una marcada inhibición a altas concentraciones del catión como también se ha descrito para otras PQA de insectos (161,189 y 299). La concentración óptima de Mg^{2+} para PQA-2 se sitúa alrededor de 10 mM como es habitual para este tipo de enzimas (36,161 y 189). Comparando las FIG 35A y 35B se observa una menor dependencia de nucleótidos cíclicos de PQA-1 respecto de PQA-2. En este sentido, se ha descrito que la isoenzima tipo II de PQA exhibe menor dependencia de nucleótidos cíclicos que la de tipo I (60,68-70).

T A B L A V I

Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de -
PQA-2.

Cación divalente (10mM)	Actividad de proteína quinasa (cpm ^{32}P)	
	Control	+ cAMP
Ninguno	1378	1327
Ca ²⁺	473	425
Co ²⁺	1008	10937
Cu ²⁺	287	298
Mg ²⁺	6076	66869
Mn ²⁺	443	916
Zn ²⁺	303	283

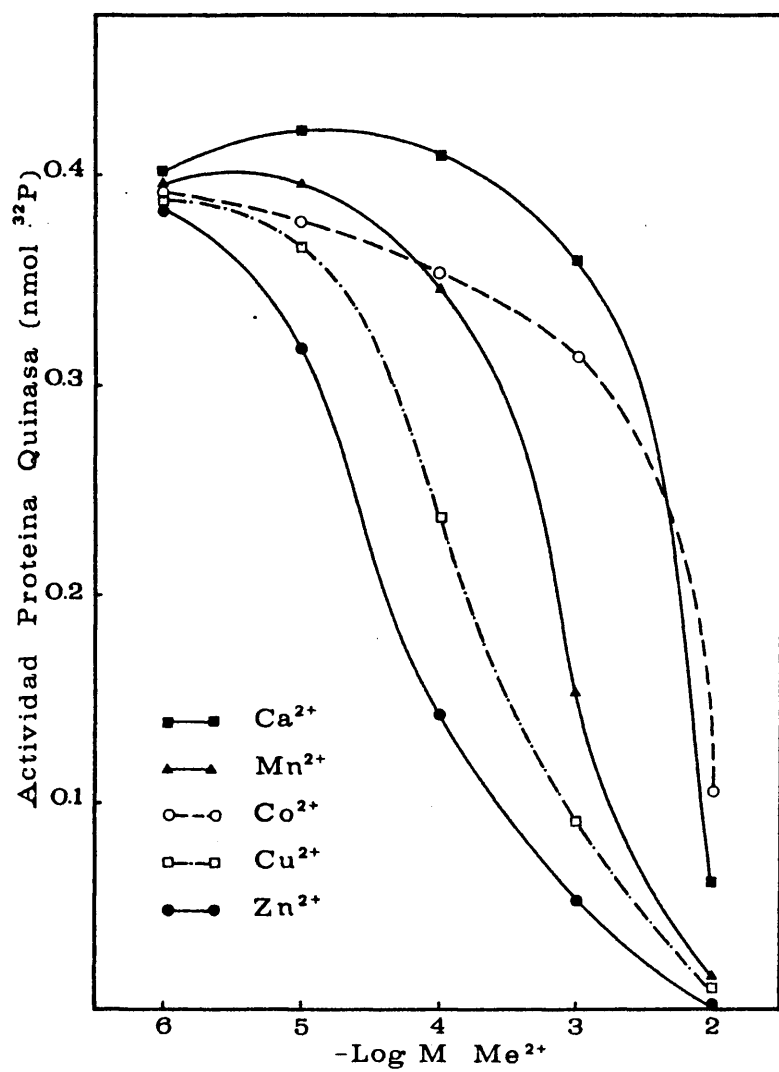


FIG.34.- Efecto de la concentración de cationes divalentes sobre la actividad de la enzima PQA-2.

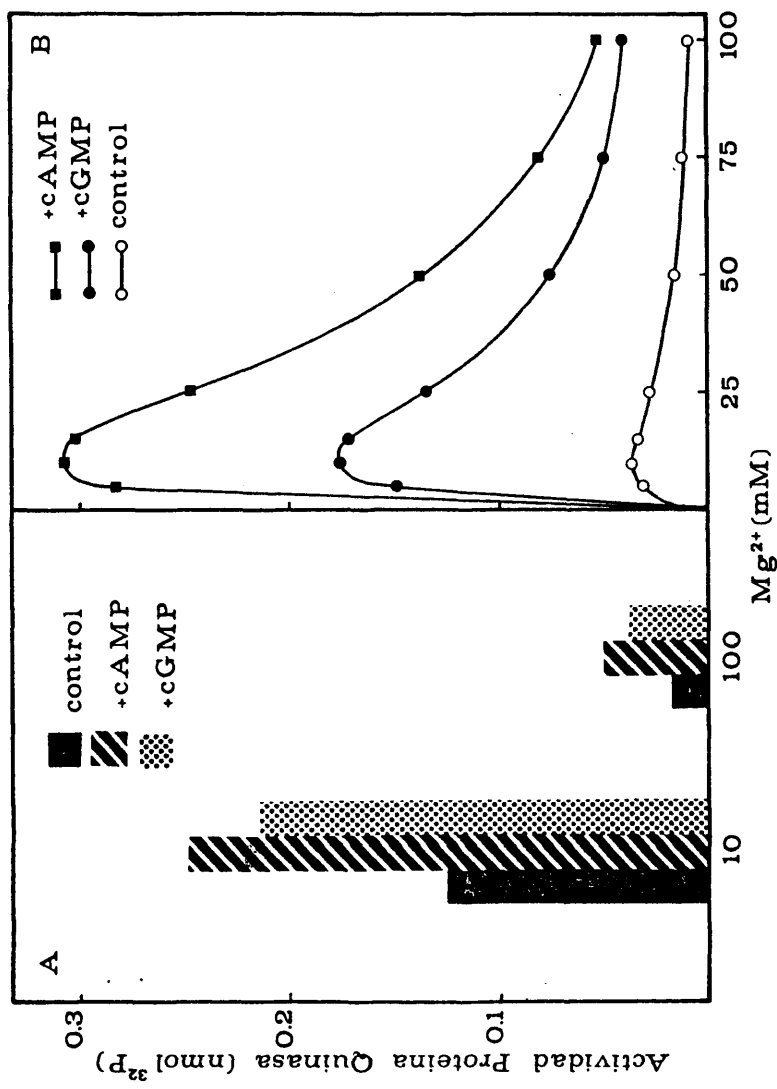


FIG. 35.- Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de las enzimas PQA-1 (A) y PQA-2 (B).

3.3.5.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad y la disociación de la enzima.

Se ha descrito la inhibición de la proteína quinasa dependiente de cAMP al aumentar la fuerza iónica del medio de incubación (337). En las FIG 36 y 37 se muestran las inhibiciones de las actividades de PQA-1 y PQA-2 en función de la concentración de NaCl. El efecto de altas concentraciones de NaCl (500 mM) en ausencia de ATP, sobre la disociación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP se ha utilizado para su clasificación en tipos I y II (68 y 71). En estas condiciones, la holoenzima tipo I se disocia con el transcurso del tiempo midiéndose el efecto por el aumento de la relación de actividad quinásica en ausencia y en presencia de cAMP. En las condiciones estandar de ensayo (presencia de Mg.ATP) este efecto no es perceptible (68 y 71).

En las FIG 38 y 39 se representa la variación de la relación de actividad quinásica (-cAMP/+cAMP) en función de la concentración de NaCl en el ensayo. Esta relación no varía significativamente para PQA-1 (FIG 38) mientras que aumenta considerablemente para PQA-2 (FIG 39). Albin y Newburg (299) encuentran un efecto similar de la fuerza iónica sobre la actividad quinásica dependiente de cAMP de sistema nervioso de Manduca sexta que el aquí descrito para PQA-2. Estos autores interpretan este hecho como una inhibición de la unión de cAMP por las altas concentraciones salinas. Es posible, sin embargo, que el aumento de la relación de actividad quinásica se deba a la activación de una proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos que parece existir en el preparado. En nuestro caso, es posible que parte del aumento de la relación de actividad de PQA-2 sea debido a los

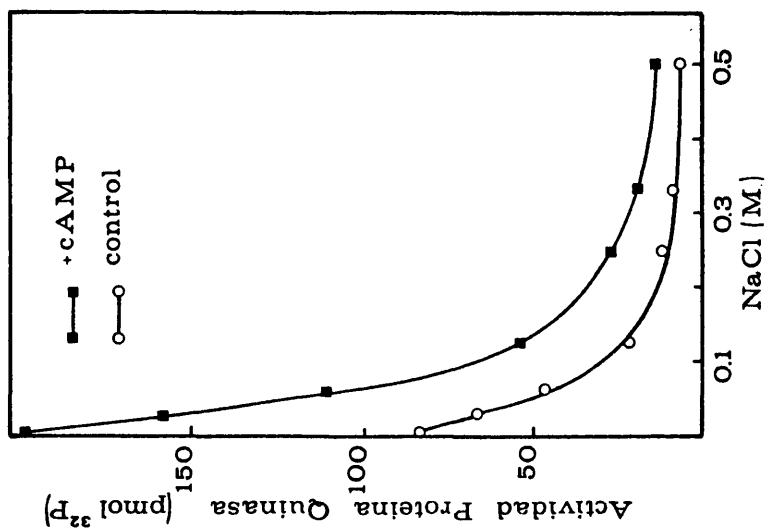


FIG.36.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la enzima PQA-1.

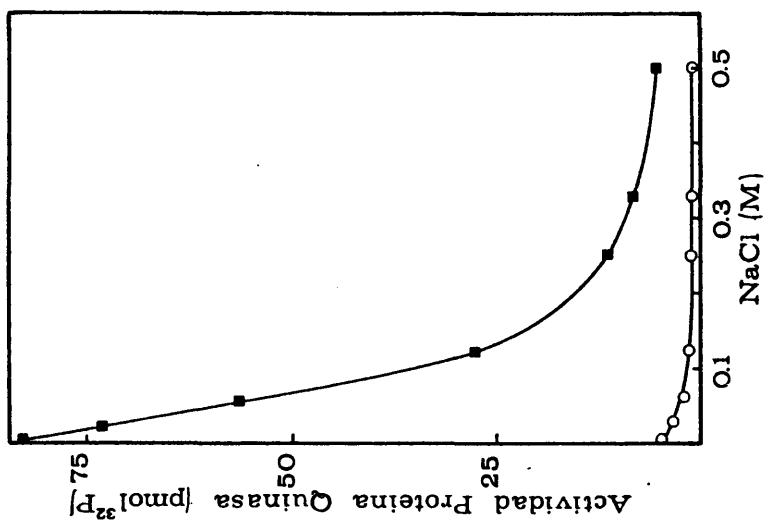


FIG.37.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la enzima PQA-2.

Relación actividad Proteína Quinasa $\left[\frac{-cAMP}{+cAMP} \right]$

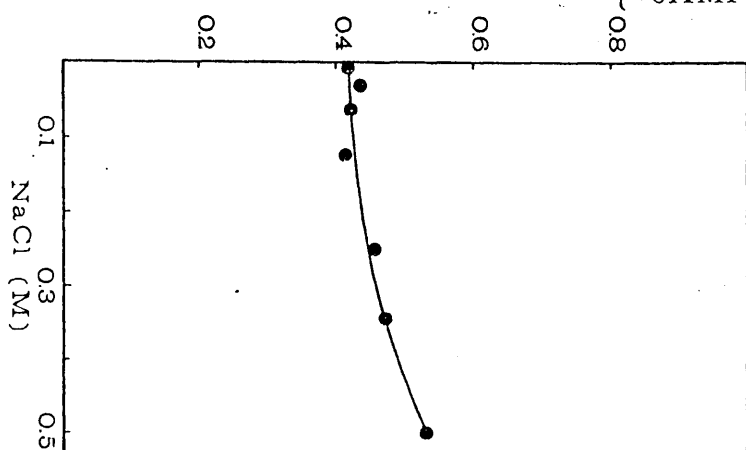


FIG. 38.- Efecto de la fuerza iónica sobre la activación de la enzima PQA.1.

Relación actividad Proteína Quinasa $\left[\frac{-cAMP}{+cAMP} \right]$

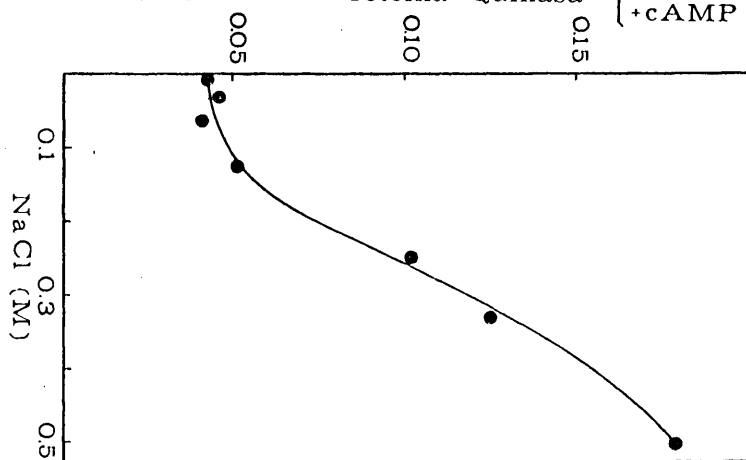


FIG. 39.- Efecto de la fuerza iónica sobre la activación de la enzima PQA.2.

bajos niveles de actividad basal (fosforilación en ausencia de -cAMP).

3.3.5.3. Efecto de la histona-sustrato y del tiempo de incubación sobre la disociación de la enzima.

La preincubación con histona en ausencia de Mg.ATP tiene unos efectos similares a los del NaCl sobre la disociación de las isoenzimas I y II (68). En la FIG 40 se representa la variación de la relación de actividad quinásica (-cAMP/+cAMP) en función del tiempo de preincubación de PQA-2 con una concentración de histona de 1 mg/ml (la misma que se utiliza habitualmente en el ensayo de actividad). El efecto disociante de la histona, dependiente del tiempo, permite clasificar inequívocamente a PQA-2 como una proteína quinasa dependiente de cAMP de tipo I (68).

Cuando se incrementa la concentración de histona en el ensayo se induce una activación de ambas formas (I y II). Es de destacar que mientras la de tipo I se disocia más fácilmente que la de tipo II por histona en ausencia de ATP, en las condiciones estándar de ensayo (presencia de ATP), ocurre lo contrario (71). En la FIG 41A se muestra el efecto disociante sobre PQA-2 de cantidades crecientes de histona en el ensayo de actividad. Comparando las FIG 40 y 41 se observa que la disociación por histona es más acentuada en ausencia de MgATP. Por otra parte, la relación de actividad quinásica (-cAMP/+cAMP) de la enzima PQA-2 aumenta progresivamente al hacerlo el tiempo de incubación (FIG 41B) como se describe para las formas I y II.

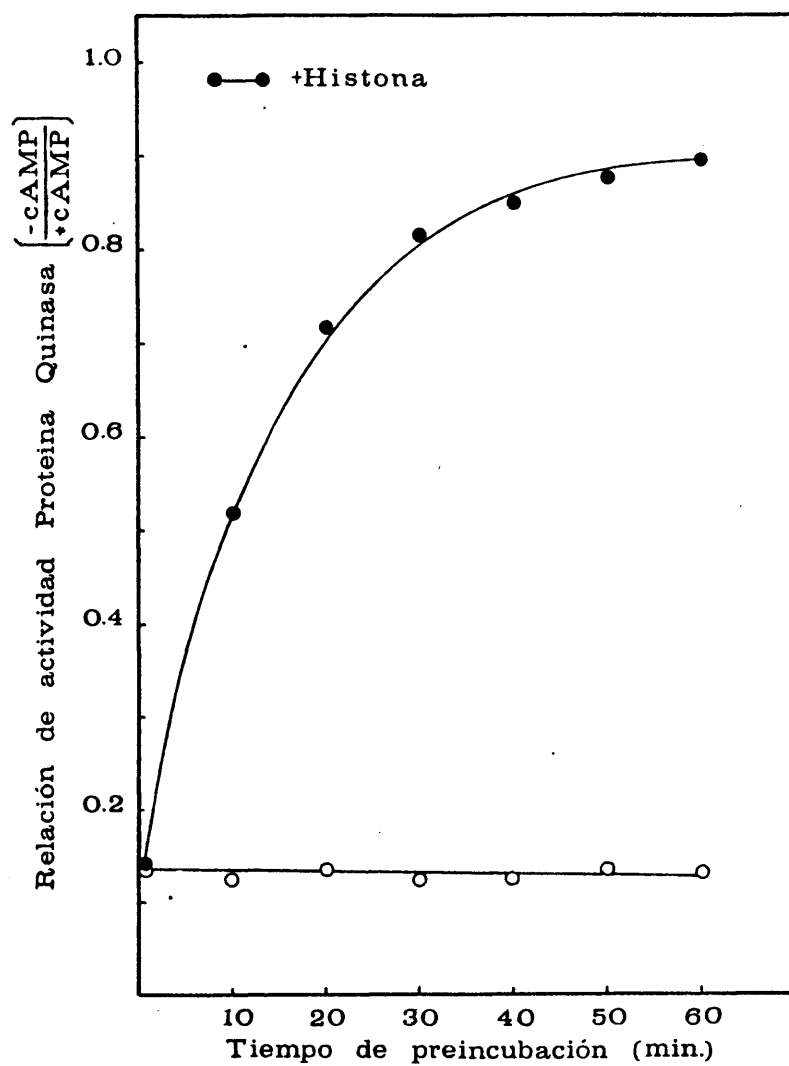


FIG. 40.- Efecto del tiempo de preincubación con histonas (fracción total; 1 mg/ml) sobre la activación de la enzima PQA-2.

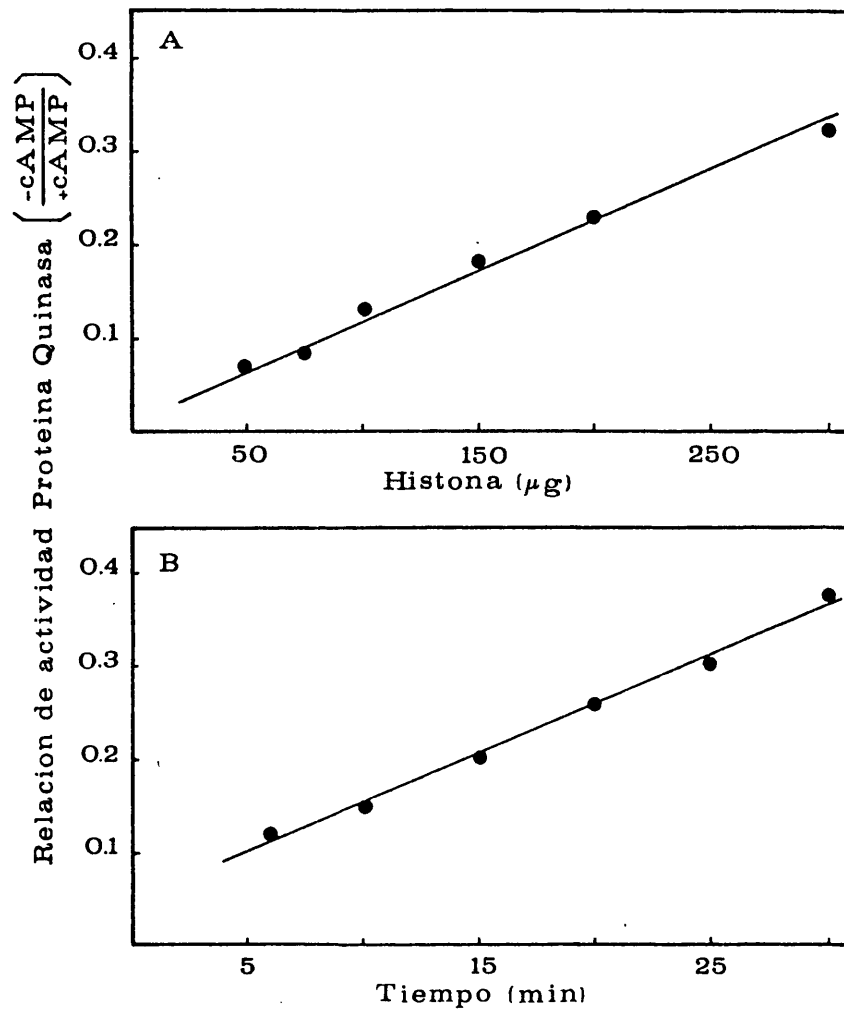


FIG.41.- Efecto de la concentración de histona en el medio de incubación (A) y del tiempo de incubación (B) sobre la activación de la enzima PQA-2.

3.3.5.4. Dependencia de la actividad con el tiempo.

En la FIG 42 se representa el aumento de la incorporación de ^{32}P en el sustrato a medida que lo hace el tiempo de incubación. En presencia de cAMP, se mantiene una relación lineal/ hasta un tiempo de 10 min.

3.3.5.5. Proteínas sustratos. Cálculo de Km para la histona.

En las FIG 43 y 44 se muestra la preferencia por distintos sustratos de PQA-1 y PQA-2, respectivamente, que en conjunto resulta muy similar. La concentración de estos sustratos es la misma que la utilizada en el ensayo estandar, 1mg/ml. El mejor sustrato para ambas enzimas es la histona H2B seguida de la H1. Las histonas H2B, H3 y H4 son peores sustratos y la fracción total de histonas, normalmente utilizada en el ensayo de actividad, se fosforila en una proporción similar a H1 por PQA-2 y algo menor por PQA-1. De las fracciones de histonas, la total y la H2B son los mejores sustratos para la PQA. Para este tipo de enzimas, en insectos, se ha descrito que la protamina es mejor sustrato que la fracción total de histonas (189,299 y 300). Por el contrario, PQA-1 y PQA-2, como sucede con las PQA de mamíferos y las PQG de insectos, fosforila mejor la mezcla de histonas que la protamina en las condiciones de ensayo empleadas.

En general, se observa mucha mayor dependencia de nucleótidos cíclicos en la fosforilación de PQA-1 que en la de PQA-2. Las histonas H1 y H2B son, por este orden, los mejores sustratos en cuanto a la detección de la activación por cAMP. El porcentaje de activación en la fosforilación de protamina por PQA-1 es mayor que el de la fracción total de histonas. Un efecto contra-

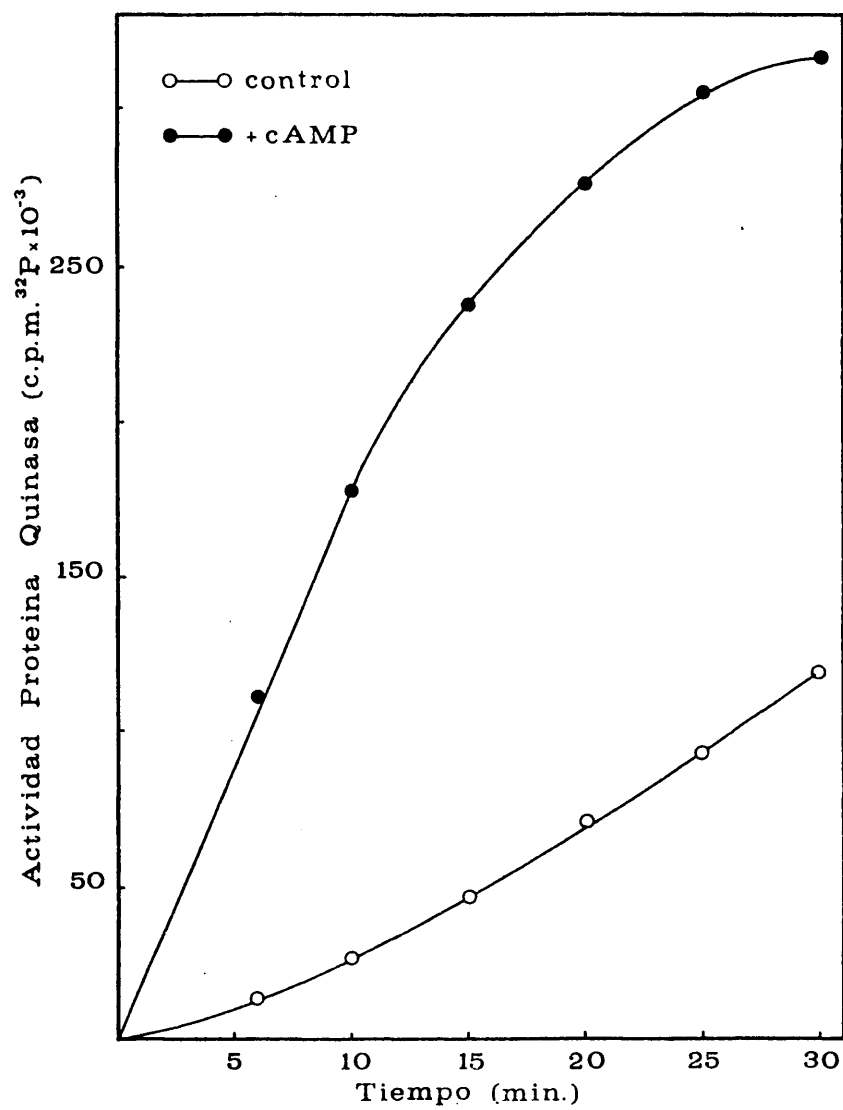


FIG.42.- Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima PQA-2.

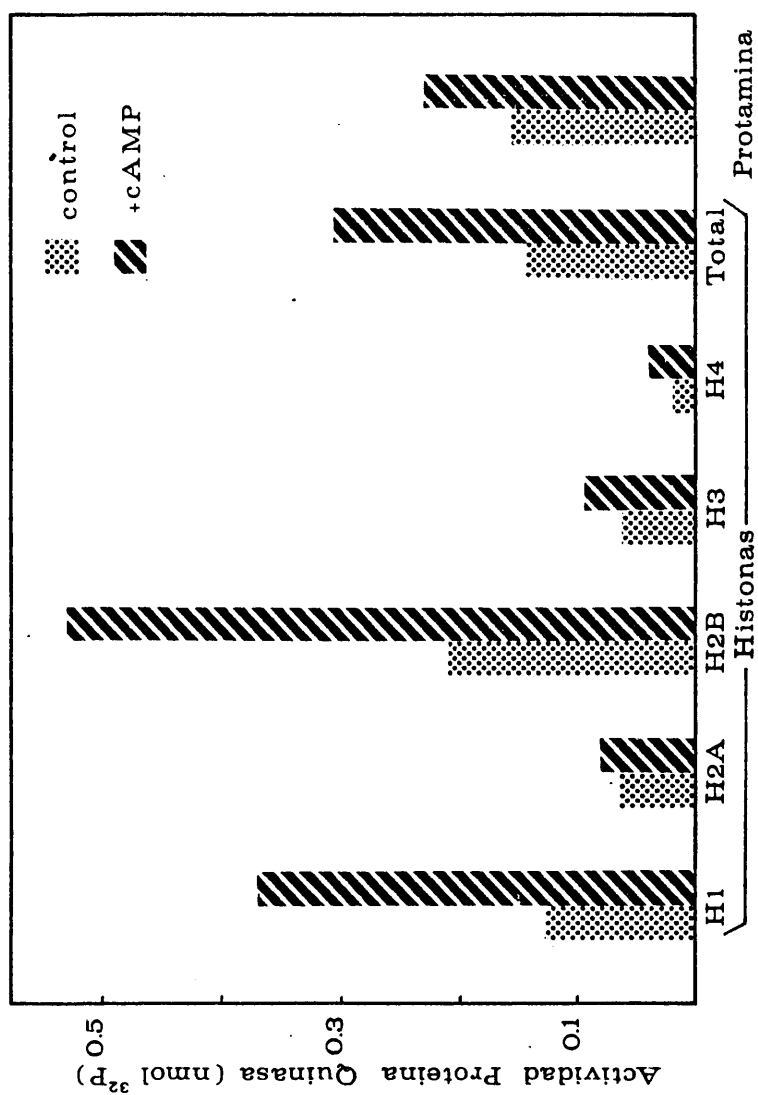


FIG.43.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas y de protamina por la enzima PQA-1.

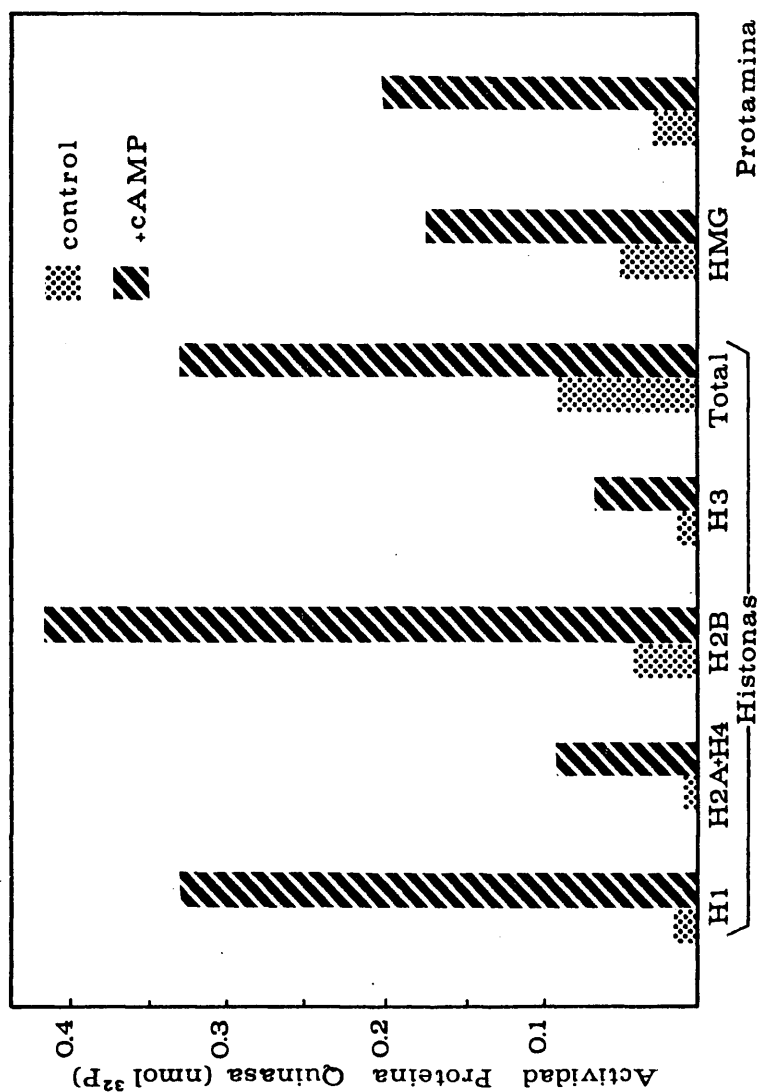


FIG. 44.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas , de proteínas no histonas (HMG) y de protamina por la enzima PQA-2.

rio se observa con PQA-2.

Kuo y Greengard (38) han estudiado la distribución de PQA en distintos tejidos y especies del reino animal encontrado que de forma opuesta a lo que sucede con las enzimas de mamíferos, las PQA de otras procedencias fosforilan mejor la caseína que las histonas. Sin embargo, y coincidiendo con los datos obtenidos para otras quinasas de insectos (189,301, 302 y 305), caseína y albúmina apenas se fosforilan.

Las proteínas no histonas, HMG, se fosforilan en una considerable extensión por PQA-2 (FIG 44). Se viene prestando una gran atención a la fosforilación de este tipo de proteínas por su relación con la estructura y función del cromosoma. En la detección de la reacción, cuando se utiliza como sustrato HMG, se añaden 500 μ l de TCA al 42% con lo que se alcanza una concentración de TCA del 30% en la mezcla de reacción que garantiza la precipitación de estas proteínas.

En la FIG 45 se representa el aumento de la incorporación de ^{32}P , catalizada por PQA-2, a medida que lo hace la concentración de histona (fracción total). La representación doble inversa de Lineweaver-Burk, permite obtener un valor de K_m ap para la histona, en presencia de cAMP, de aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.2.5.6. Activación por nucleótidos cíclicos. Cálculo de K_m para cAMP, cGMP y cIMP.

En la FIG 46 se muestra la activación de PQA-2 a diferentes concentraciones de varios nucleótidos cíclicos. El mejor ac-

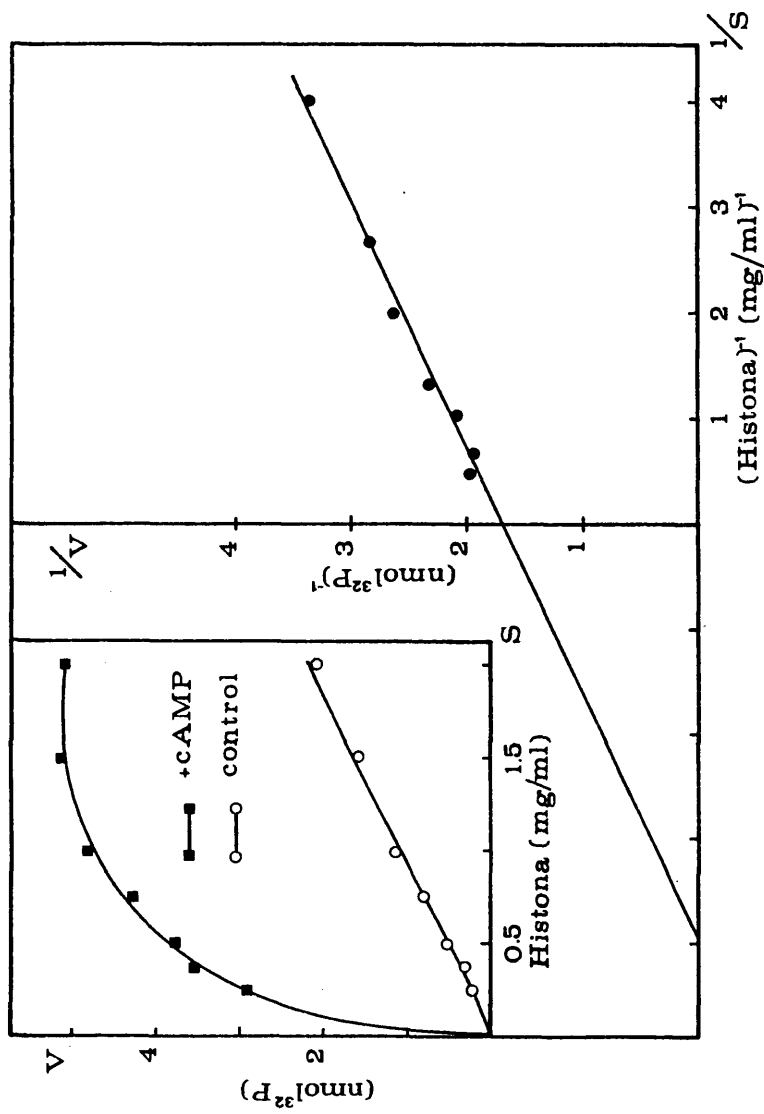


FIG.45. (A) Efecto de la concentración de histonas (fracción total) sobre la actividad de proteína quinasas de la enzima PQA-2. (B). Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasas de la enzima PQA-2 frente a histonas (fracción total), en presencia de cAMP.

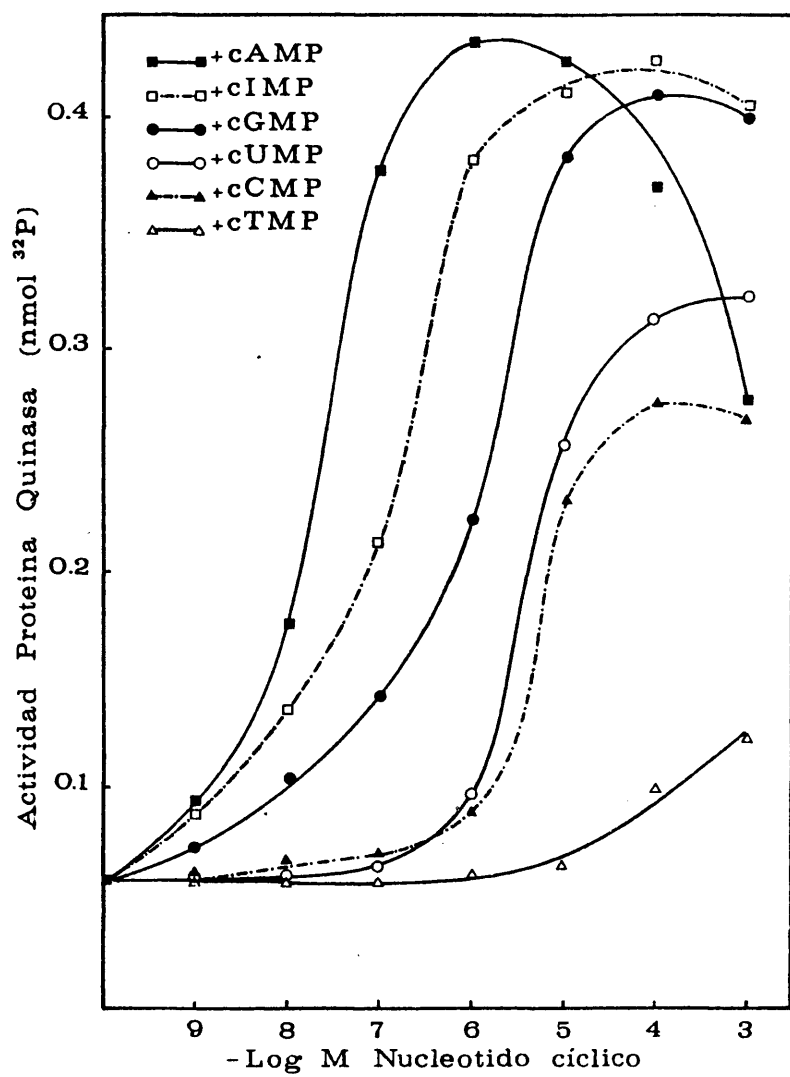


FIG. 46.- Efecto de la concentración de nucleótidos cíclicos sobre la actividad de la enzima PQA-2.

tivador a bajas concentraciones es el cAMP, sin embargo, resulta inhibidor cuanto estas se elevan. El efecto, que se supone producido por la competencia con el sitio activo para el ATP, se ha descrito frecuentemente. El cIMP promueve una activación intermedia entre el cAMP y el cGMP como ocurre con la mayoría de las proteínas quinasas dependientes de cAMP (216). De los otros tres nucleótidos cíclicos, cUMP y cCMP sólo activan la enzima a altas concentraciones, mientras que cTMP prácticamente no tiene efecto. - Se ha encontrado el mismo orden correlativo de activación por - estos nucleótidos cíclicos para las distintas proteínas quinasas/ dependientes de cAMP de larva y adulto de la cucaracha Periplaneta americana, con una activación para el cIMP intermedia entre la del cAMP y cGMP (300).

Los valores de K_a (concentración de nucleótido cíclico - necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima) aproximados, obtenidos en las condiciones de ensayo utilizadas, para - cAMP, cIMP y cGMP son respectivamente 0.022 μM , 0.17 μM y 1.4 μM . La significación que tienen estos valores es simplemente comparativa ya que como se ha indicado anteriormente, la magnitud de K_a varía con la concentración de la enzima (16, 51, 99 y 138). El valor de K_a para el cAMP de PQA-2 está comprendido dentro de los - descritos en la bibliografía para otras proteínas quinasas dependientes de cAMP de insectos que oscilan entre 4.2 nM para la enzima de cubierta de larva de polilla cecropia (189) y 0.05 μM para la de huevos de Drosophila melanogaster (49) con valores de K_a para las enzimas de larva y adulto de Drosophila melanogaster de 0.019 μM y 0.033 μM , respectivamente.

3.3.5.7. Cálculo de K_m para ATP y K_d para cAMP.

En la FIG 47 se muestra el efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de PQA-2 en una representación doble inversa (Lineweaver-Burk) con el fin de calcular el valor de K_m . - La complejidad de la cinética se puede deber a la presencia simultánea en el preparado enzimático de la supuesta forma nativa/ y su agregado que presumiblemente tienen distinta afinidad por - el ATP y a las que corresponderían unos valores de K_m ap. para - este sustrato de aproximadamente $5 \mu M$ y $84 \mu M$. Aunque no se pueden establecer comparaciones directas entre estos valores y los/ datos existentes en la bibliografía para otras proteína quinasas dependientes de cAMP de insectos ya que las condiciones del ensayo son muy variables, el menor valor de K_m es similar al de la - enzima de huevo y pupa de Bombyx mori (301 y 303), mientras que el valor de K_m más elevado es del orden del obtenido para las - distintas proteínas quinasas dependientes de cAMP de adulto de - la cucaracha Periplaneta americana (300).

Los valores de K_d ap para cAMP (concentración de nucleotido cíclico necesaria para la mitad de la máxima unión) son de/ aproximadamente $40 \mu M$ y $7.7 \mu M$ (FIG 48), el primero de ellos similar al valor de K_a para cAMP de PQA-2 y al de K_d para el cAMP de la proteína quinasa dependiente de cAMP de huevos de Drosophila melanogaster (49). La unión de cAMP a la subunidad reguladora de esta última enzima sigue una línea recta en una representación de Scatchard, mientras que la unión a la holoenzima, como - ocurre con la enzima PQA-2 (no se representan los datos), resulta en una curva bifásica que indica que en la unión está implicada más de una reacción (49). La representación doble inversa --

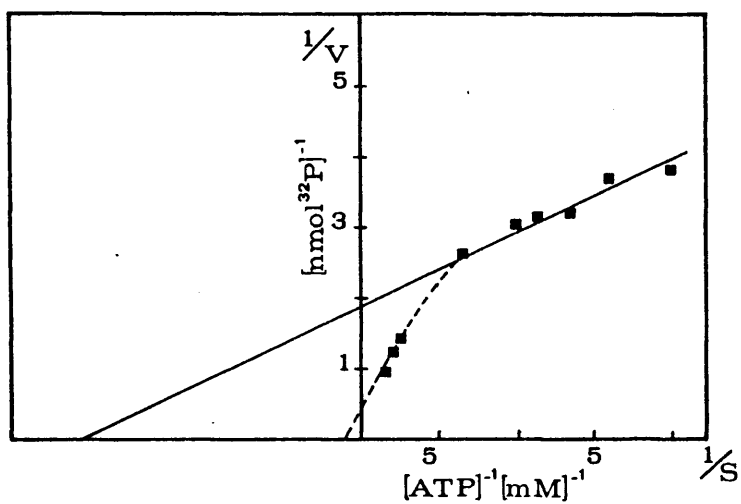


FIG. 47.- Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de la enzima PQA-2 frente a ATP en presencia de cAMP.

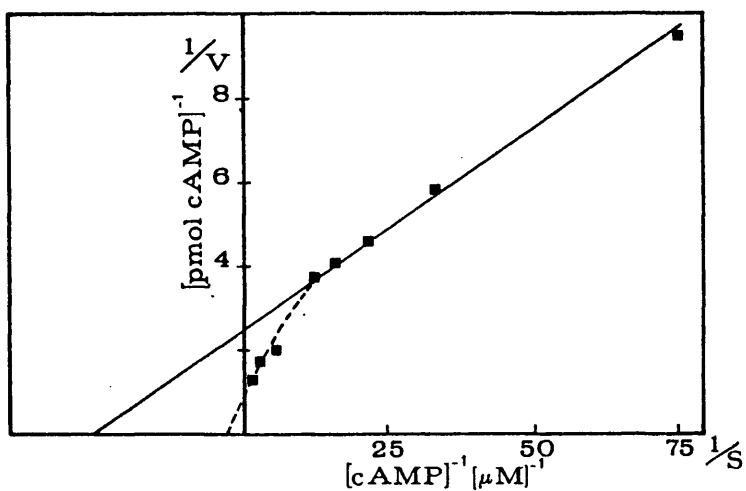


FIG. 48.- Representación de Lineweaver-Burk para la actividad ligante de cAMP de la enzima PQA-2 frente a cAMP.

(Lineweaver-Burk) para la unión del cAMP a la holoenzima (ensayo tipo B en Tampón fosfato) (FIG 48), muestra una estrecha similitud con la del ATP (FIG 47), lo que sugiere que la naturaleza de/ambos comportamientos puede tener el mismo origen.

3.4. Proteína quinasas dependientes de cGMP de fracción soluble

Como se ha expuesto en el apartado 2.2.1 y salvo que se/indique lo contrario, la determinación de la actividad de proteí/na quinasa dependiente de cGMP se lleva a cabo con una concentra/ción 100 mM de Mg^{2+} en el ensayo.

3.4.1. Aislamiento y purificación.

Las distintas etapas del proceso se resumen en el ESQUE-MA 2.

En la FIG 49 se representa la actividad quinásica del -eluido resultante de cromatografiar en hidroxiapatito el sobrenadante de ultracentrifugación SUC. En esta etapa, utilizando unas peculiares condiciones de elución (pequeño volumen de gradiente/respecto al tamaño de la columna), que proporcionan una alta reso/lución, se consigue la separación de PQG y PQA que constituye -junto con la inestabilidad de la primera, el principal inconveniente para su purificación. Aunque las condiciones del ensayo -favorecen la actividad de PQG, esta es minoritaria.

El perfil de actividad que se muestra en la FIG 49, en -la que se destacan los tres componentes enzimáticos que se han -señalado en los experimentos preliminares, es muy similar al ob-

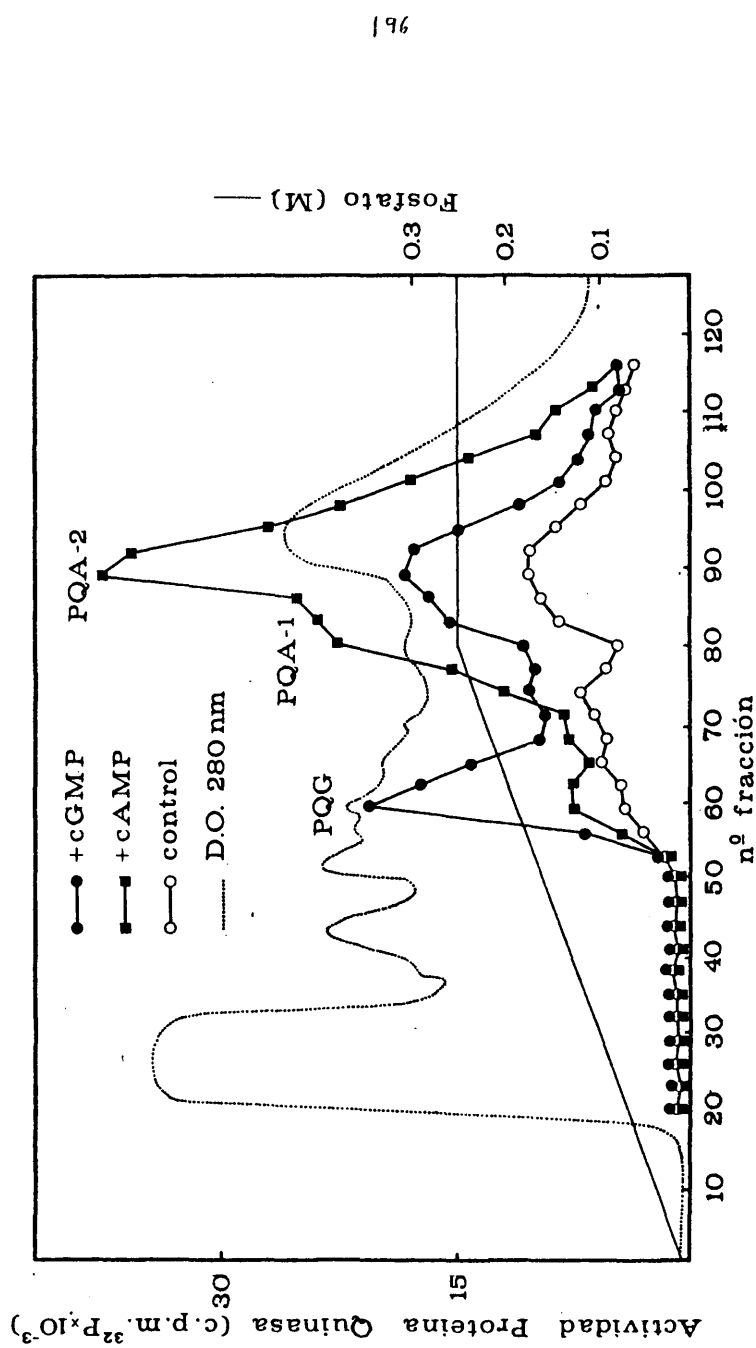


FIG. 49.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxipatito del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de adulto farato (ensayo de actividad en presencia de 100mM de Mg^{2+}).

tenido en la cromatografía en Biogel HTP de un preparado de cuerpo graso de adulto hembra de la cucaracha Periplaneta americana (300) en el que aparecen dos actividades dependientes de cAMP -- parcialmente solapadas, minoritaria la que eluye a menor molaridad, y una proteína quinasa que muestra una dependencia similar de cAMP y cGMP que se ha interpretado como una actividad dependiente de cGMP que presentaría este peculiar comportamiento debido a la contaminación parcial de las proteínas quinasas dependientes de cAMP.

En la FIG 50 se muestra la actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en DEAE-celulosa las fracciones/ con actividad de PQG procedentes de hidroxapatito. Aparece un único máximo de actividad dependiente de cGMP, lo que indica una buena resolución en Biogel HTP.

En la FIG 51 se representa el perfil de actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en Ultrogel AcA 44/ el preparado con actividad de PQG procedente de DEAE-celulosa. - Aparece un máximo de actividad de PQG, mayoritario, acompañado de un pequeño pico de actividad quinásica, prácticamente independiente de nucleótidos cíclicos en las condiciones del ensayo, que puede haberse originado durante el proceso de purificación o simplemente arrastrado a lo largo del mismo.

En la FIG 52 se comparan los volúmenes de elución en -- Ultrogel AcA 44 de PQA y PQG en idénticas condiciones cromatográficas. La FIG 52A corresponde al máximo de actividad de PQA y de su forma agregada y la 52B al máximo de actividad de PQG. Se puede concluir que PQG tiene un tamaño similar a la forma no agregada

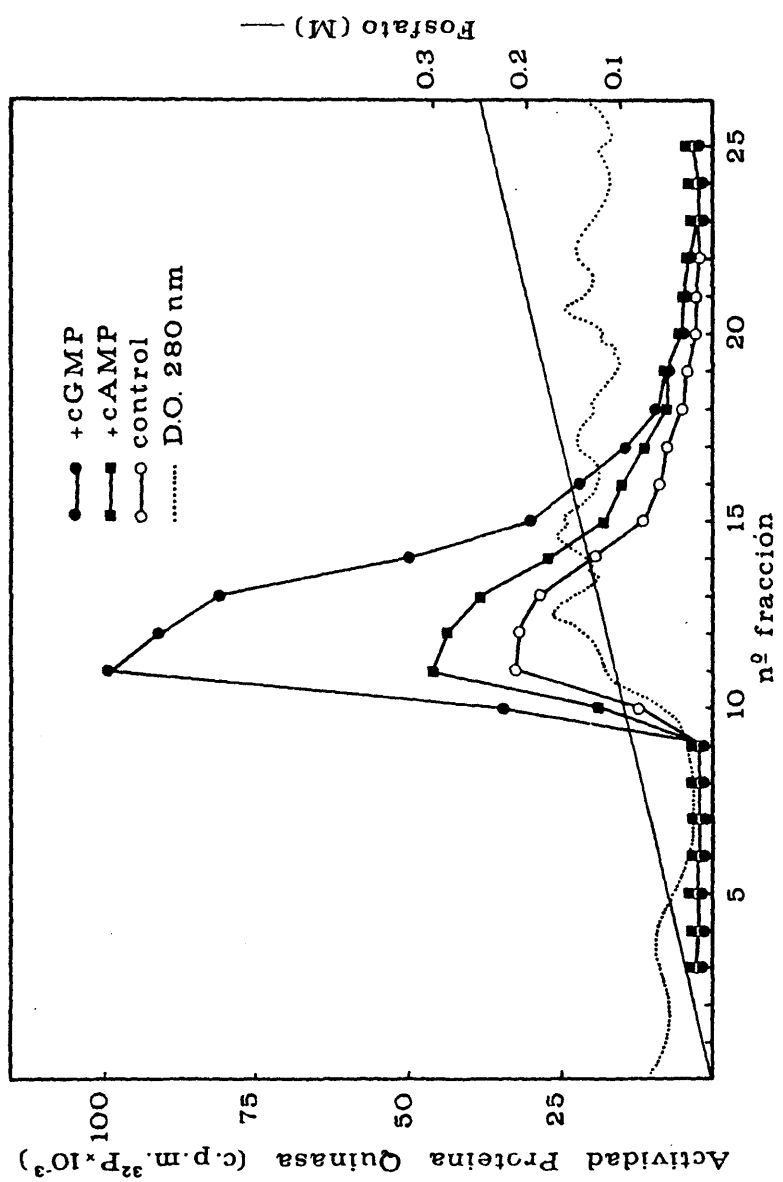


FIG. 50.- Perfil del eluido de la cromatografía en DEAE-celulosa de la enzima PQQ.

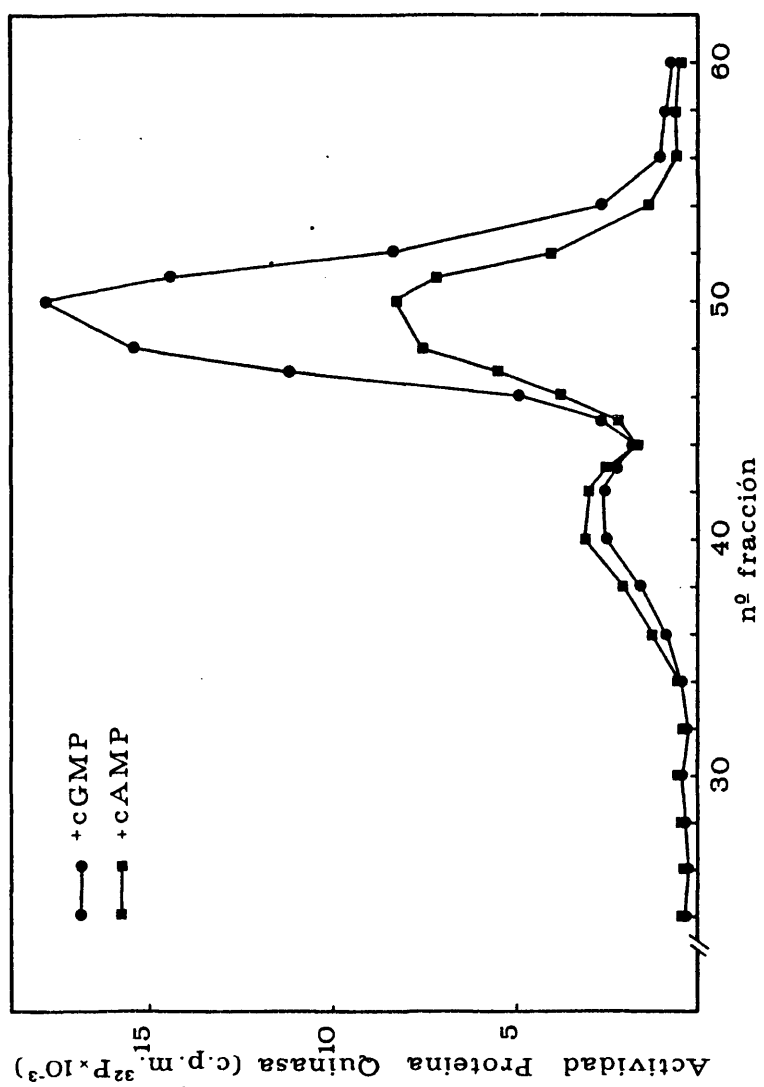


FIG.51.- Perfil del eluido de la cromatografía en Ultrogel AcA 44 de la enzima PQG.

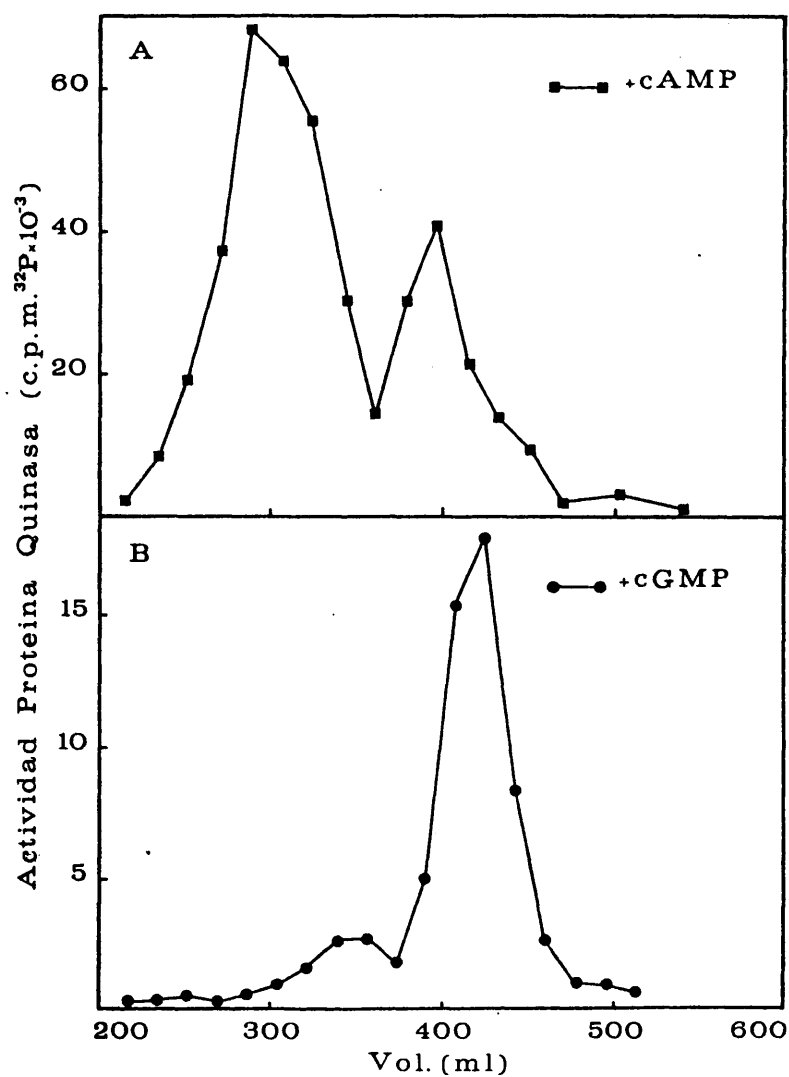


FIG. 52.- Comparación de los perfiles de elución de las cromatografías en Ultrogel AcA 44 de las actividades de proteína quinasa dependientes de cAMP (A) y de cGMP (B). El ensayo de actividad se realiza en (A) en presencia de cAMP y en (B) en presencia de cGMP.

da de PQA (o algo menor), parecido al de la PQG obtenida de huevos de Bombyx mori (72.000 D) (301). Estos resultados son compatibles con una estructura monomérica para ambas enzimas lo que -- constituye una excepción dentro de este tipo de proteína quinasas. Además de la mencionada, la única proteína quinasa dependiente de cGMP de insectos cuyo tamaño se ha calculado es la de pupa de -- Bombyx mori de estructura dimérica y peso molecular 140.000 D -- (303). Aun en el supuesto de que las proteínas, presumiblemente monoméricas, de huevos de Bombyx mori y adulto farato de Ceratitis capitata procedan de la disociación de la estructura dimérica durante el proceso de purificación, su activación por cGMP es difícil de compaginar con los mecanismos propuestos a tal efecto (56).

3.4.2. Caracterización enzimática.

Los preparados enzimáticos utilizados proceden del eluido de Ultrogel AcA 44.

3.4.2.1. Efecto de cationes divalentes.

En la TABLA VII se muestra el efecto de distintos cationes divalentes sobre la actividad de PQG. Como está descrito, la enzima requiere un catión divalente, con preferencia Mg^{2+} y Co^{2+} , en este orden (239). El Mn^{2+} es menos eficaz mientras que Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ca^{2+} inhiben, por este orden, la actividad enzimática. Unos requerimientos similares tiene la PQG de huevos de gusano de seda (301).

Resulta interesante que el Co^{2+} estimula la PQG de langosta en mayor extensión que el Mg^{2+} (188). En la FIG 53 se representan

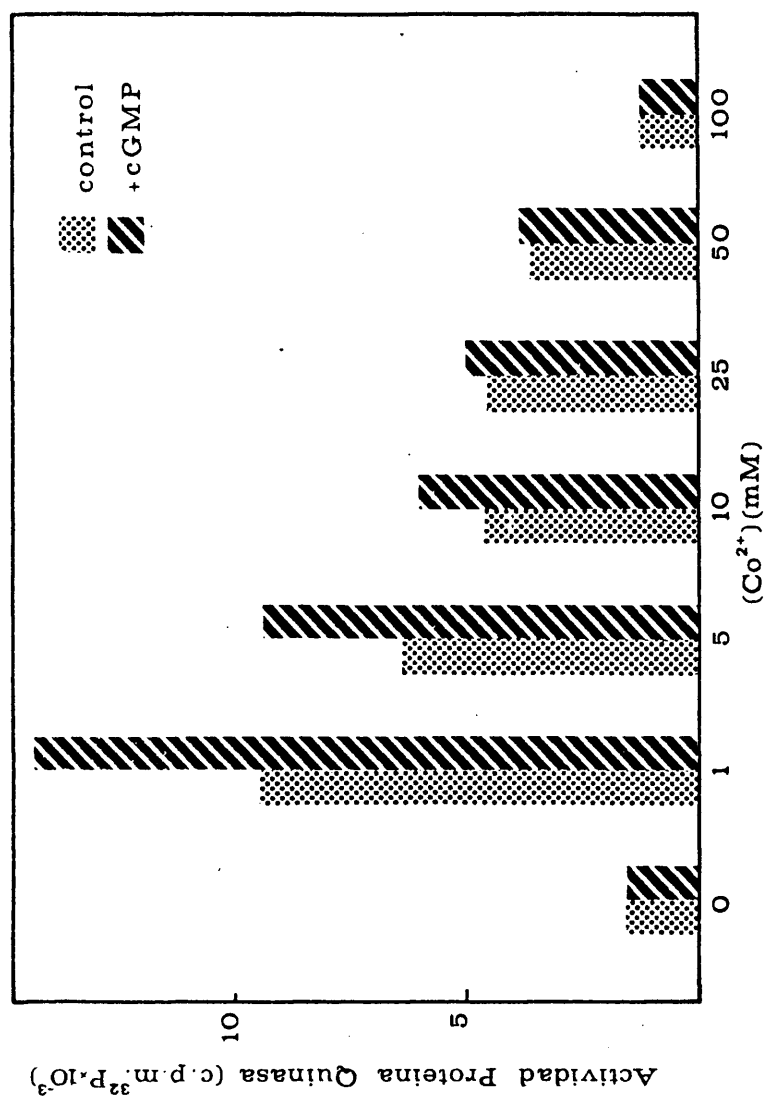
ta el efecto de distintas concentraciones de Co^{2+} sobre la actividad de la enzima. El máximo se sitúa alrededor de una concentración 1mM del catión como se describe para otras PQG de insectos (189 y 304) y mamíferos (239). Se ha comprobado con diversas clases de proteína quinasas que la actividad con 10 mM de Co^{2+} / respecto a la actividad con 10 mM de Mg^{2+} es mucho mayor en tampón glicerofosfato, pH 6.5, que en tampón acetato a pH 6.0 (189).

T A B L A VII

Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de - PQG.

<u>Catión divalente (10mM)</u>	<u>Actividad de proteína quinasa (cpm ^{32}P)</u>	
	<u>Control</u>	<u>+ cGMP</u>
Ninguno	1559	1510
Ca^{2+}	606	577
Co^{2+}	4519	6079
Cu^{2+}	412	448
Mg^{2+}	11621	14206
Mn^{2+}	3121	3803
Zn^{2+}	255	266

La respuesta a los cationes divalentes, además de ser modificada por el tampón, depende del sustrato empleado en el ensayo de actividad (200). En las FIG 54 y 55 se muestra el perfil de actividad de PQG en presencia de distintas concentraciones de Mg^{2+} utilizando como sustratos la fracción total de histonas o protamina, respectivamente. Con histona, la máxima actividad y --

FIG.53.- Efecto de la concentración de Co^{2+} sobre la actividad de la enzima POG.

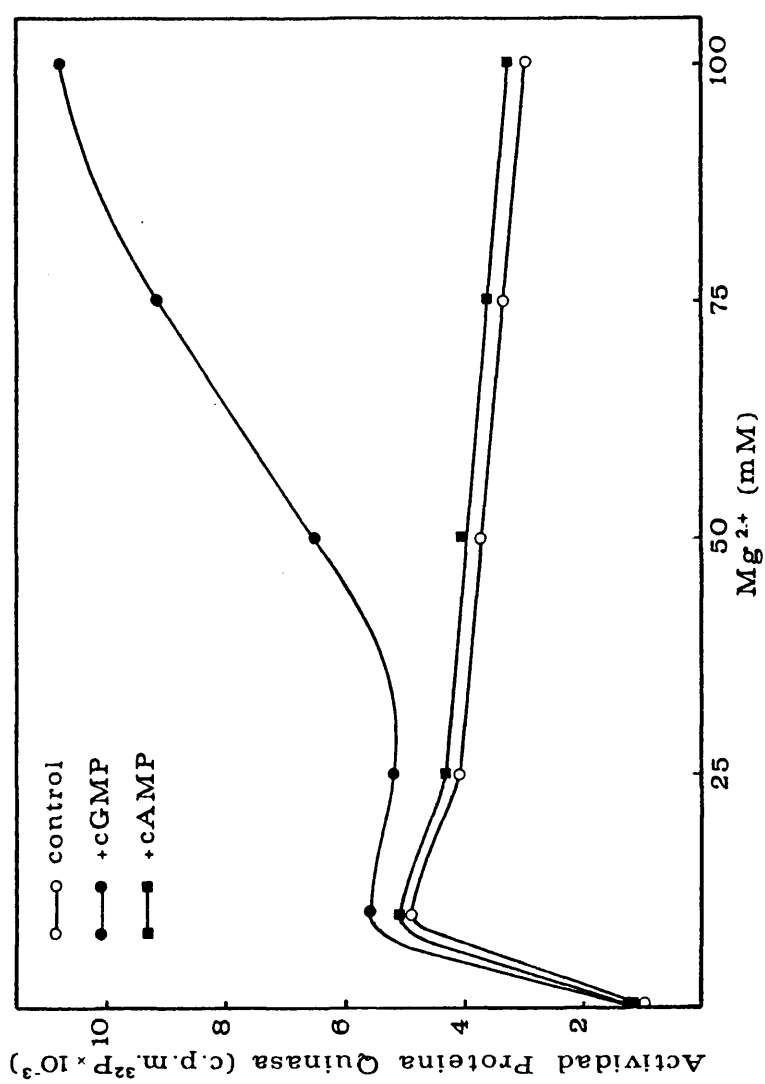


FIG.54.- Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima POG utilizando histonas como sustrato.

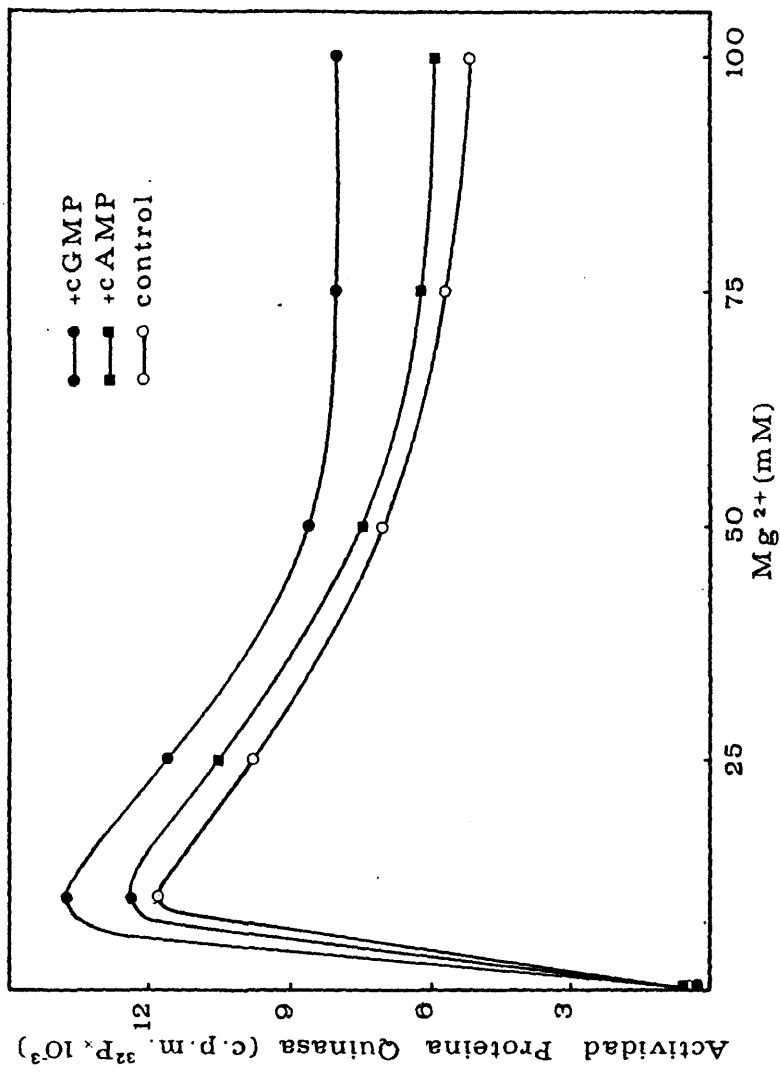


FIG. 55.- Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima PQQ, utilizando protamina como sustrato.

activación se alcanza a elevadas concentraciones del catión --
(100 mM de Mg^{2+}) (FIG 54), mientras que con protamina se sitúa al
rededor de 10 mM (FIG 55). Es de destacar la mayor activación -
por cGMP obtenida con histona que con protamina.

Se ha descrito la necesidad de incluir altas concentra-
ciones de Mg^{2+} (50-100 mM) en el ensayo de actividad de PQG de -
diversa procedencia (160,161,192,193 y 199). La curva bifásica -
de activación por la concentración de Mg^{2+} mostrada en la FIG 54
es muy similar a la obtenida para la PQG de pupa de gusano de se-
da (161), resultando apenas perceptible la activación por cGMP a/
bajas concentraciones del catión. Un comportamiento similar se ha
descrito para la PQG de cuerpo graso de Locusta migratoria (305).
Recientemente (304), sin embargo, se ha descrito que la concen-
tración óptima de Mg^{2+} para la PQG de cuerpo graso de pupa de gu-
sano de seda se sitúa alrededor de 5mM, más parecida a la concen-
tración de Mg^{2+} de 10 mM requerida para la máxima activación de/
PQG de huevos de gusano de seda (301), cuya afinidad por el ca-
tión divalente se afecta por el cGMP.

2.4.2.2. Proteínas sustratos.

En la FIG 56 se muestra la fosforilación por PQG de di-
versas fracciones de histonas y de la protamina, que en conjunto
es muy similar a la obtenida con PQA-1 y PQA-2. El mejor sustra-
to resulta ser la histona H2B aunque con muy poca diferencia con
respecto a la H1. La activación obtenida con las distintas frac-
ciones de histonas es similar y muy superior a cuando se utiliza
protamina. Como generalmente ocurre con la PQG de artropodos --
(189) la fracción total de histonas se fosforila mejor que la -

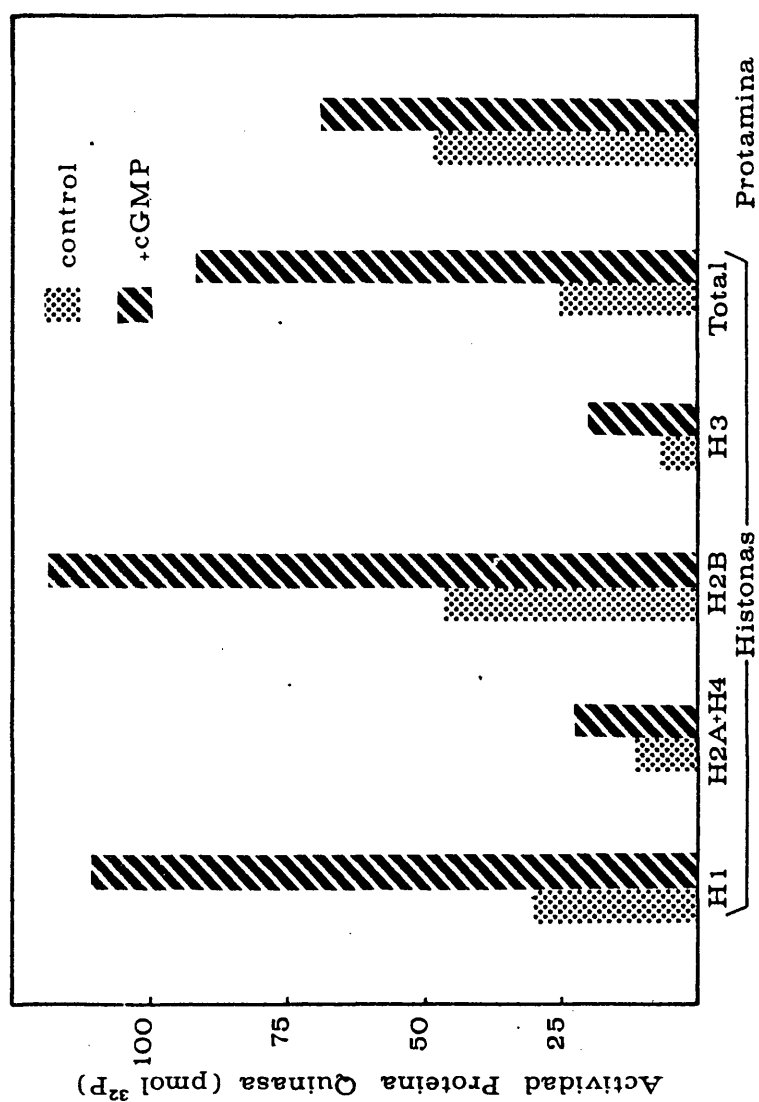


FIG.56.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas y de protamina por la enzima POG.

protamina. Con la PQG de huevos de gusano de seda, sin embargo, ocurre lo contrario (301). Caseína y albúmina, como sucede con otras proteína quinasas de insectos (189,300,301 y 305), son pobres sustratos para la PQG de Ceratitidis capitata.

Es de destacar que la preferencia por una u otra fracción de histona puede depender de su concentración en el ensayo. Así, utilizando la PQG de cubierta de larva de polilla cecropia, a concentraciones por debajo de 100 μg la fracción total de histonas y la H2B son fosforiladas en la misma extensión, mientras que a concentraciones más elevadas, la mezcla de histonas se fosforila mejor (189).

3.4.2.3. Activación por nucleótidos cíclicos. Cálculo de K_a para cAMP, cGMP y cIMP.

En la FIG 57 se representa la activación de PQG por diferentes concentraciones de varios nucleótidos cíclicos. El mejor activador a bajas concentraciones es el cGMP; cIMP y cAMP activan por igual la enzima como se ha descrito para las proteína/quinasas dependientes de cGMP (216); cCMP y cUMP activan solamente a muy altas concentraciones y cTMP prácticamente no tiene efecto. La acción de estos tres últimos nucleótidos cíclicos sobre PQG, es muy parecida a la que se observa para la PQA-2 (FIG 46).

Los valores de K_a para cGMP, cIMP y cAMP, son de modo aproximado, respectivamente, 0.074 μM , 1 μM y 1.5 μM . Los valores de K_a para el cGMP de distintas PQG de insectos oscilan entre 7.5 nM para la enzima de pupa de Bombyx mori (303), y -

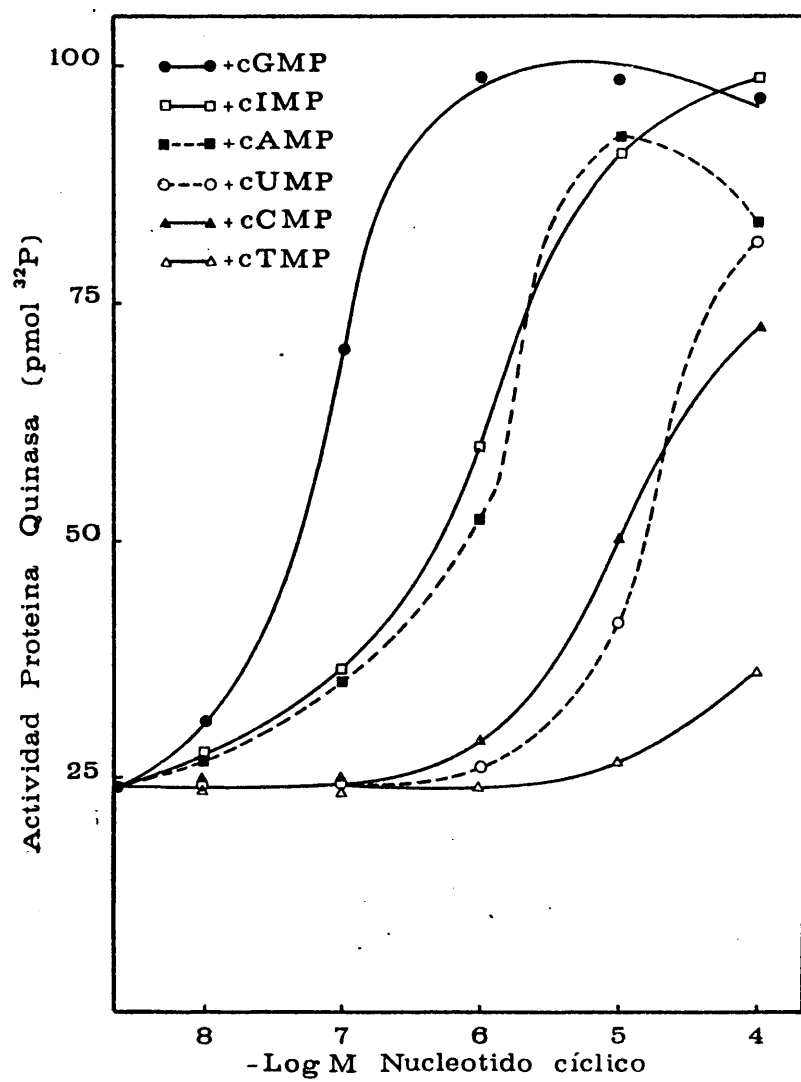


FIG. 57.- Efecto de la concentración de nucleótidos cíclicos sobre la actividad de la enzima PQG.

0.48 μM para la de cuerpo graso de adulto de cucaracha (189). - Los valores de K_a para el cGMP de las PQG de tejidos de mamíferos oscilan entre 0.03 y 0.12 μM (239).

3.4.2.4. Efecto de proteínas inhibidoras.

En la FIG 58 se muestra el efecto sobre la actividad - de PQG de la proteína inhibidora de conejo, aislada originalmente por Walsh y col (150). Como se ha descrito para la PQG de pupa de gusano de seda (161) y de otras procedencias, la enzima - obtenida de Ceratitis capitata no se efecta por la acción de la/ proteína inhibidora, cuya especificidad por PQA (152,160) se ha/ utilizado para distinguir esta enzima de otras proteína quinasas (162).

Se ha descrito, sin embargo, que la PQG de cuerpo graso de Locusta migratoria se inhibe por esta proteína (305). Estos resultados, no obstante, pueden ser debidos a algún otro tipo de factor presente en el homogeneizado.

3.4.2.5. Efecto de compuestos con grupos tiólicos.

Takai y col (161) han encontrado que contrariamente a/ lo que sucede con otras PQG, la enzima de Bombyx mori tiene requerimiento absoluto de compuestos tiólicos para su activación - por cGMP. Otros investigadores, sin embargo, han descrito que compuestos de este tipo, como 2-mercaptoetanol, no son necesarios - ni para la actividad basal de la enzima ni para su estimulación/ por cGMP (304). En la FIG 59 se muestra el efecto que ejercen -- distintas concentraciones de 2-mercaptoetanol sobre la actividad de la enzima. Su presencia no afecta sensiblemente la actividad/

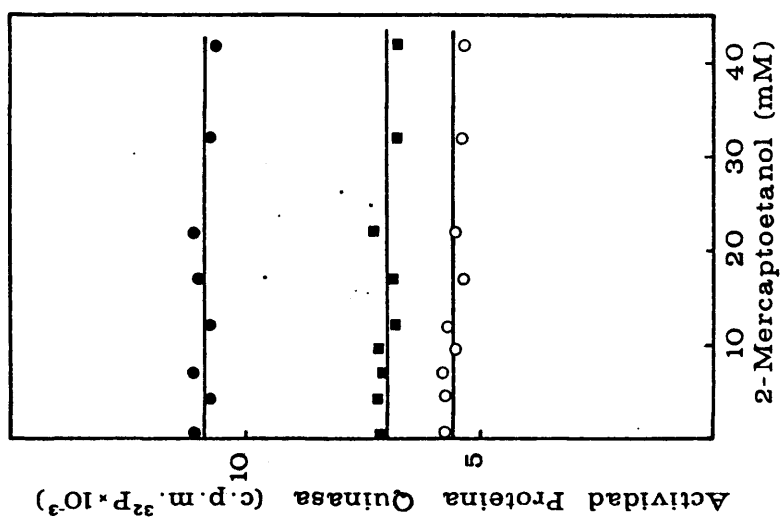


FIG. 59.- Efecto de la concentración de compuestos tiólicos sobre la actividad de la enzima PQG.

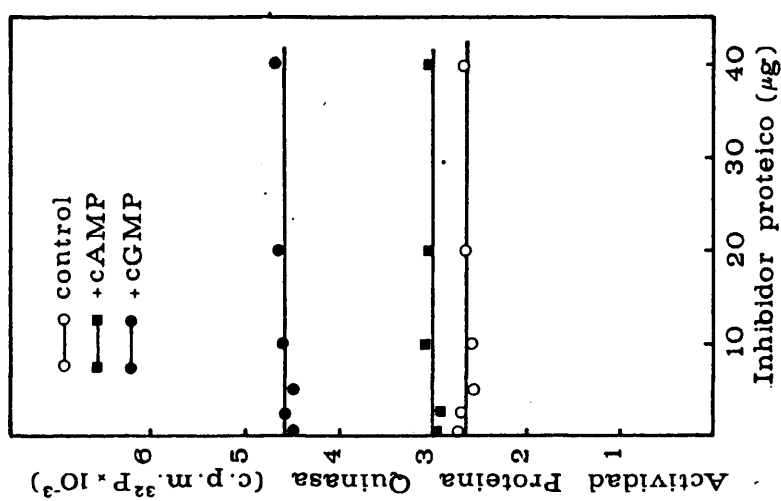


FIG. 58.- Efecto de la proteína inhibidora sobre la actividad de la enzima PQG.

de PQG de Ceratitidis capitata.

3.4.2.6. Cálculo de Km para el ATP.

En la FIG 60 se muestra el efecto de la concentración/ de ATP sobre la actividad de PQG. La representación de Lineweaver -Burk permite obtener una Km ap de la enzima para el ATP de 9 μM tanto en ausencia como en presencia de cGMP. Los valores de Km - para el ATP de las proteína quinasas dependientes de cGMP de hue- vos (30.3 μM) (301) y pupa (14 μM) (161) de Bombyx mori tampoco/ se afectan por el nucleotido cíclico. Se ha descrito que el cGMP disminuye el valor de Km para el ATP de 0.63 μM , sin nucleotido - cíclico, a 0.21 μM , con nucleotido cíclico, en la fosforilación de/ histona catalizada por PQG de pulmón fetal (193).

Como se ha mencionado anteriormente utilizando histonas como sustrato, el efecto de la variación de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima sigue el hábito de una - curva bifásica (FIG 42), con requerimientos extremadamente altos/ de concentración del catión para la actividad de la enzima y la/ estimulación por cGMP. En la FIG 61 se representa el efecto que/ sobre la Km para el ATP tiene la variación de la concentración - de Mg^{2+} . Los valores de Km obtenidos para 15, 75 y 100 mM de Mg^{2+} en el ensayo son 28, 14 y 9 μM , respectivamente, sin una variación apreciable de la $V_{\text{máx}}$. Este análisis cinético indica que el efec- to de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima -- puede ser debido, al menos en parte, a la disminución de los valo- res de Km para el ATP en presencia de elevadas concentraciones - del catión. Resultados similares se han obtenido con la PQG de pu- pa de Bombyx mori (161, 204).

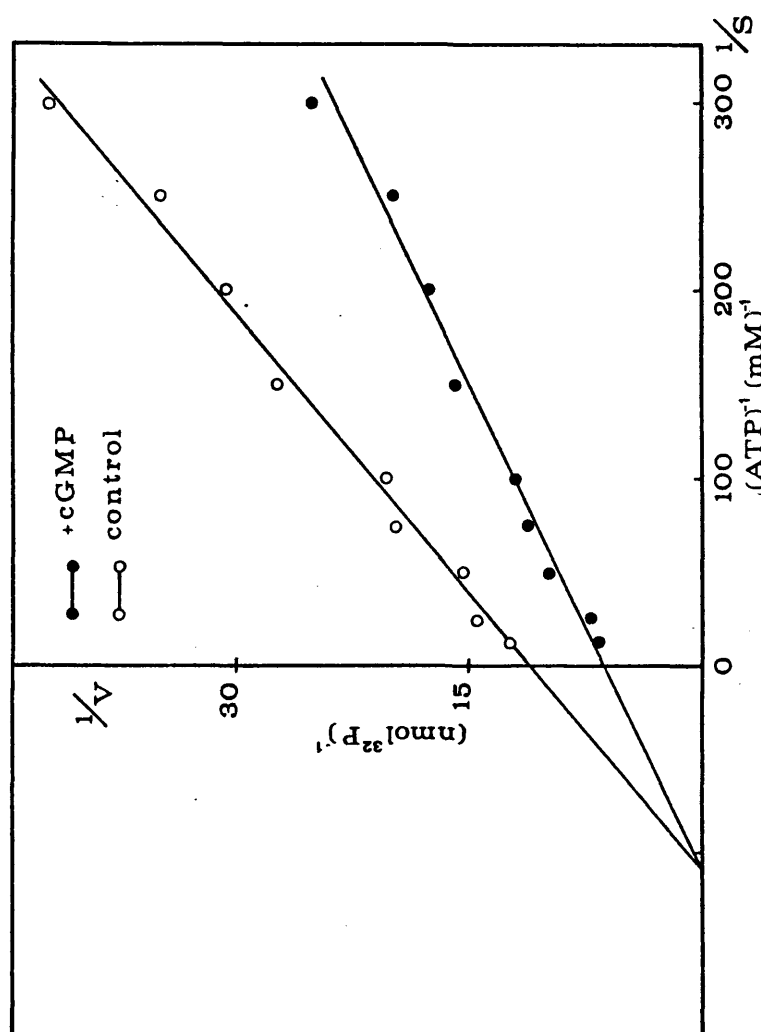


FIG.60.- Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de la enzima PQG frente a ATP.

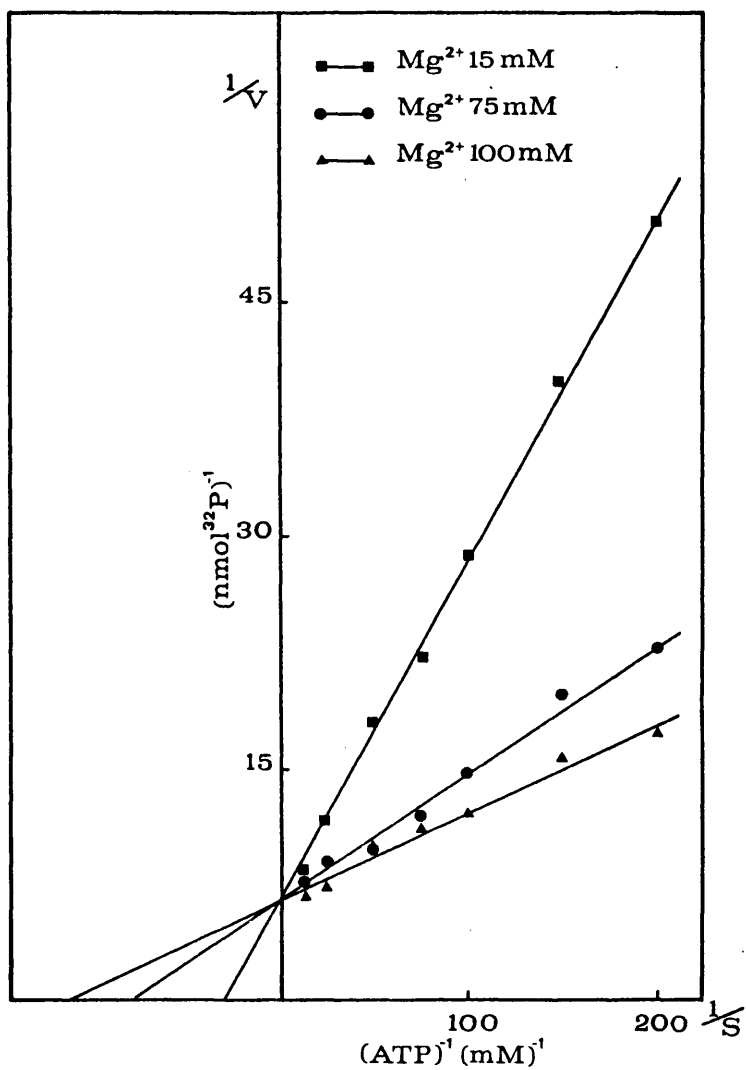


FIG. 61.- Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de la enzima POG frente a ATP en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} y cGMP.

3.5. Proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos de fracción soluble.

3.5.1. Aislamiento y purificación.

Las etapas del proceso se resumen en el ESQUEMA 3.

En la FIG 62 se representa el perfil de actividad quinásica resultante de cromatografiar en fosfo~~celulosa~~ el sobrenadante de centrifugación dializado obtenido de adulto farato. Aparecen dos picos de actividad quinásica muy próximos, resultando mayoritario el que eluye a molaridad más alta y ambos independientes de nucleótidos cíclicos. La actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP se encuentra en la fracción no retenida. A la actividad quinásica del primer máximo se le denomina PQI-1 y a la del segundo PQI-2.

La FIG 63 corresponde a la actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en Biogel HTP las fracciones con actividad de PQI-2 procedentes de la fosfo~~celulosa~~. Es destacable la alta molaridad a la que eluye esta enzima en hidroxapatito, lo que permite la eliminación de una gran cantidad de proteína -- en el lavado previo de la columna con tampón fosfato 200 mM antes de aplicar el gradiente. La única actividad de proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos descrita en insectos es la de larva de la cucaracha Periplaneta americana (300), que eluye en Biogel HTP a más alta molaridad (por encima de 200 mM de fosfato) que las proteína quinasas dependientes de cAMP. Esta actividad independiente de nucleótidos cíclicos está mayoritariamente presente en ovarios de cucaracha (300).

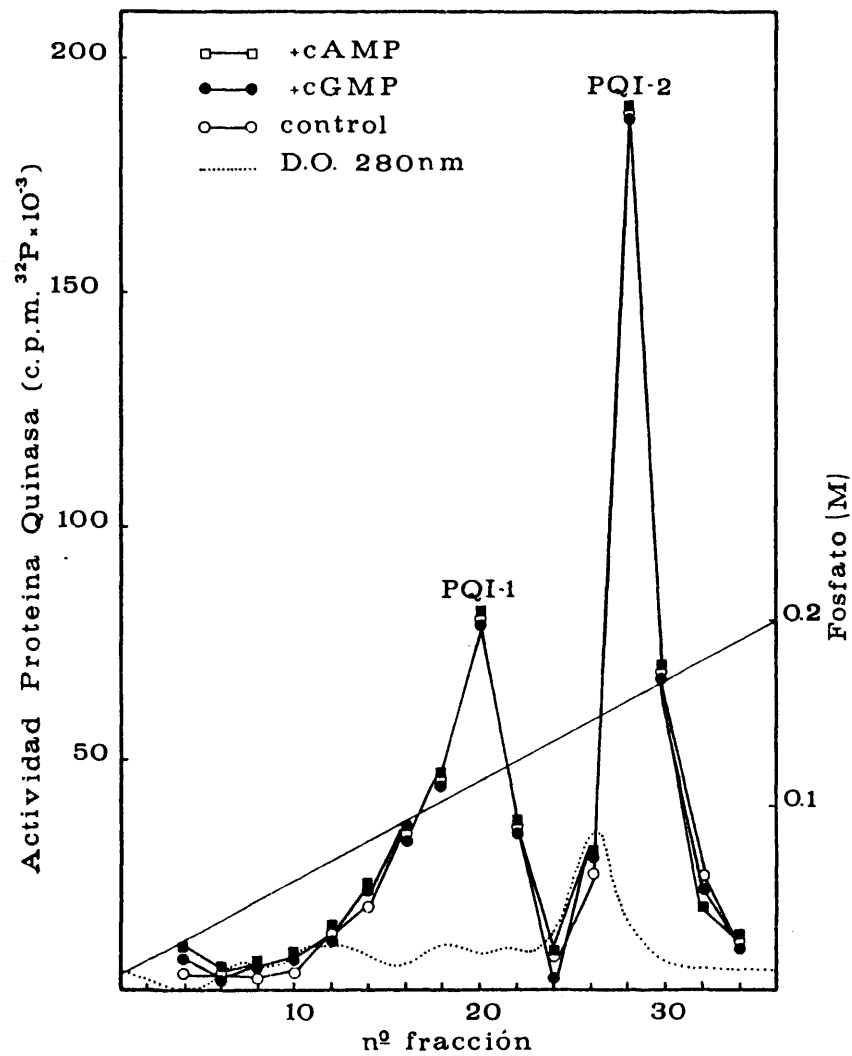


FIG. 62.- Resolución de las enzimas PQI-1 y PQI-2 en fosfocelulosa.

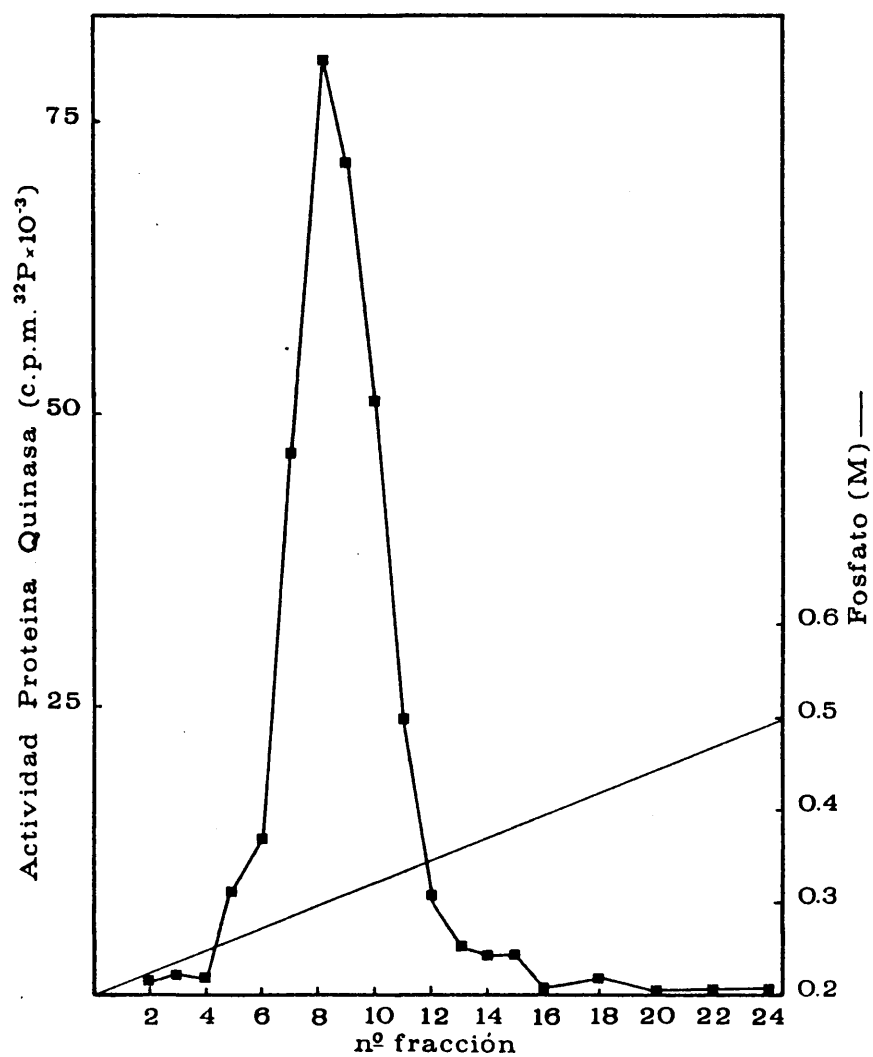


FIG. 63.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxapatito de la enzima PQI-2 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

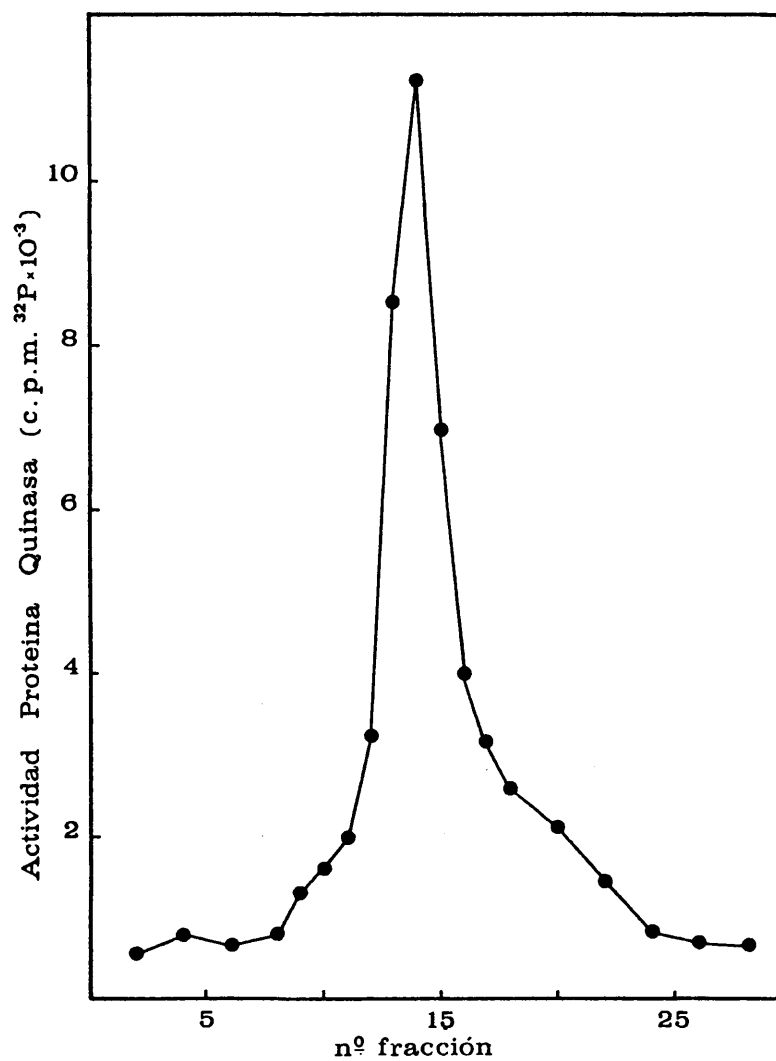


FIG. 64.- Perfil de actividad del eluido de la cromatografía en Sephadex G-100 de la enzima PQL-1 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

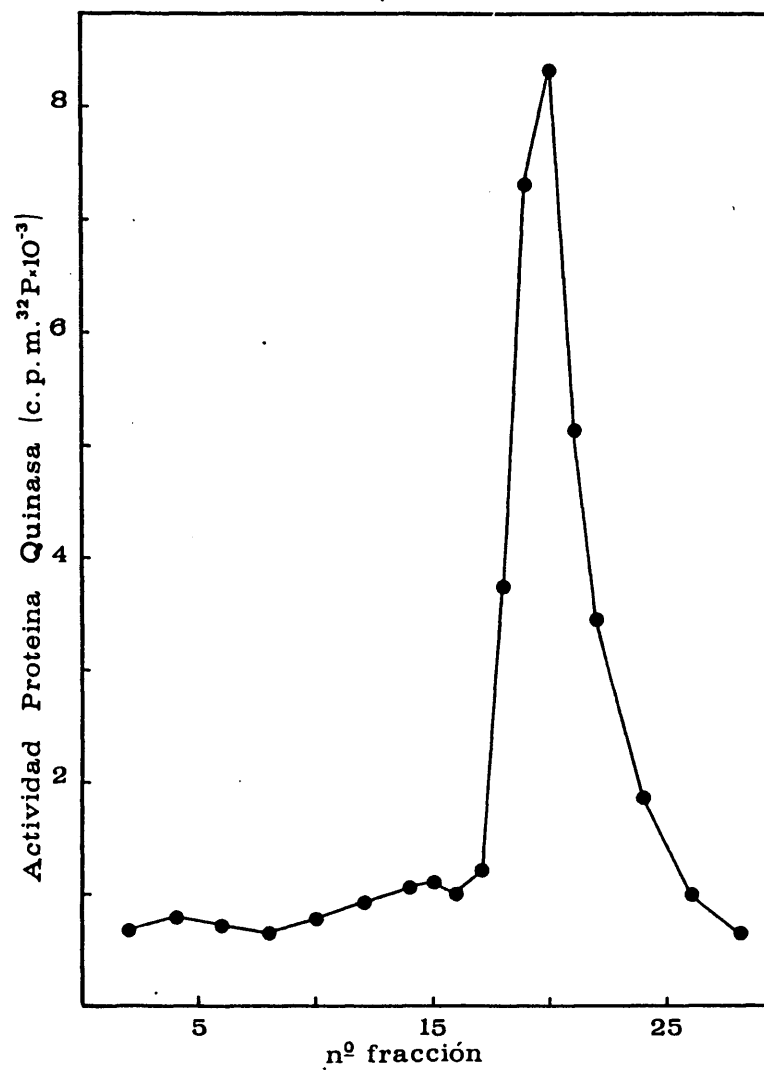


FIG.65.- Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-100 de la enzima PQI-2 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

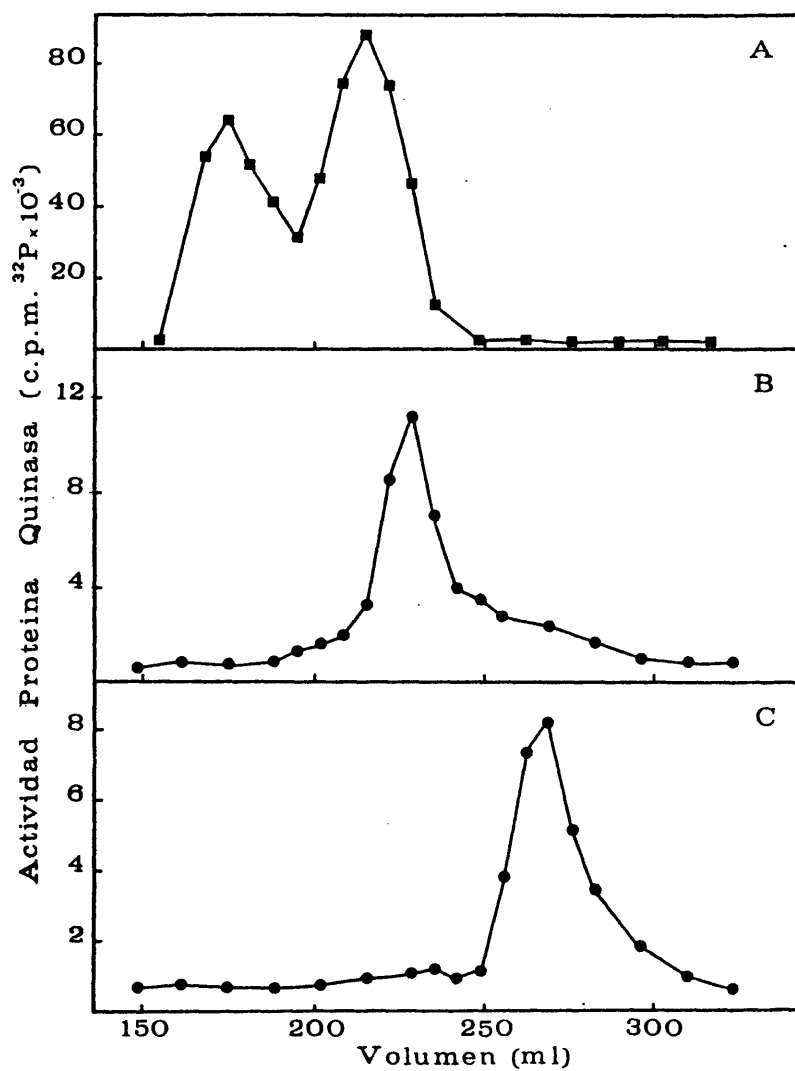


FIG.66.- Comparación de los perfiles de los eluidos de las cromatografías en Sephadex G-100 de las actividades de proteína quinasa dependientes de cAMP (A) (ensayo en presencia de cAMP) e independientes de nucleótidos cíclicos (B y C).

En las FIG 64 y FIG 65 se representa la actividad quínásica del eluido resultante de cromatografiar en Sephadex G-100 los preparados enzimáticos obtenidos al concentrar las fracciones con actividad de PQI-1 de la fosfocelulosa y PQI-2 del hidroxipatito, respectivamente.

En la FIG 66 se comparan los volúmenes de elución en -- Sephadex G-100 de PQA, en sus formas nativa y agregada (FIG 66A), de PQI-1 (FIG 66B) y de PQI-2 (FIG 66C). Se puede concluir que al igual que ocurre con la PQG (FIG 52), el tamaño molecular de PQI-1 es similar (o algo menor) al de la forma nativa de PQA, mientras que el de PQI-2 es considerablemente menor que el de PQI-1.

3.5.2. Relación de las proteína quinasas independientes de nucleótidos cíclicos con otros componentes del sistema proteína quinasa.

Existe cierta evidencia de una posible relación entre PQI-1 y PQG. La más inmediata es la similitud de sus tamaños moleculares puesta de manifiesto anteriormente. Además, preparados de PQI-1 conservados en cámara fría (4-6°C) durante un tiempo prolongado, exhiben una cierta dependencia de cGMP y en algunas cromatografías en fosfocelulosa se ha detectado una ligera dependencia de cGMP en el primer pico de actividad.

Se ha detectado también una débil actividad ligante de cAMP en preparados de PQI-1 correspondientes a las etapas de fosfocelulosa y Sephadex G-100 que presenta una cierta proporcionalidad con la actividad quínásica, lo que no ocurre con preparados de PQI-2 (TABLA VIII).

T A B L A VIII

Actividad proteína quinásica y ligante de cAMP de diversos preparados de PQI-1 y PQI-2.		
Preparado enzimático (etapa de purificación)	Actividad proteína (1) ligante de cAMP (cpm ³ H)	Actividad de proteína quinasa (cpm ³² P)
PQI-1 (Fosfocelulosa)	1795	33328
PQI-1 (Sephadex G-100)	1014	10235
PQI-2 (Fosfocelulosa)	420	54608
PQI-2 (Biogel HTP)	216	124765
(1) Método B en tampón fosfato.		

Teniendo en cuenta estos resultados se podría pensar - que PQI-1 procede de PQG a través, por ejemplo, de un cambio conformacional que relajase la estructura de la enzima originando - la pérdida de dependencia de cGMP pero conservando la actividad/ catalítica o bien mediante una proteólisis parcial. En este sentido, Huang y Huang (339) han encontrado que la proteína quinasa dependiente de cAMP purificada a partir de músculo esquelético de conejo puede ser transformada por tripsina en una forma independiente, siendo debida la activación, aparentemente, a una modificación de la subunidad reguladora. Algo similar se ha descrito - para la proteína quinasa dependiente de cGMP (198,201). No obs--

tante, cuando se cromatografía en fosfocelulosa un preparado parcialmente purificado de la proteína quinasa dependiente de cGMP, no se observa ni siquiera una retención parcial de la misma.

Por otra parte, considerando los tamaños moleculares - de PQI-1 y PQI-2 y la tendencia a la agregación de algunos componentes del sistema proteína quinasa, la primera podría ser un simple agregado de la segunda.

No se descarta tampoco la posibilidad de que PQI-1 tenga una entidad propia de proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos, sin que por ello tenga que estar relacionada necesariamente con PQI-2. En este sentido, es de destacar que es frecuente en estudios con preparados parcialmente purificados de proteína quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, su cromatografía previa en fosfocelulosa al objeto de eliminar las actividades quínásicas independientes de nucleótidos cíclicos, que generalmente se retienen en este cambiador, para evitar su interferencia en las determinaciones cinéticas (71).

2.5.3. Caracterización enzimática.

2.5.3.1. Requerimiento de catión divalente.

En las FIG 67 y 68 se representa la variación de la actividad quínásica de PQI-1 y PQI-2, respectivamente, en función de que la concentración de Mg^{2+} en el ensayo. Ambas enzimas tienen un requerimiento absoluto de Mg^{2+} y en ausencia del mismo, la actividad enzimática es muy baja. La concentración óptima de este catión divalente se sitúa alrededor de 10 mM, con una mar-

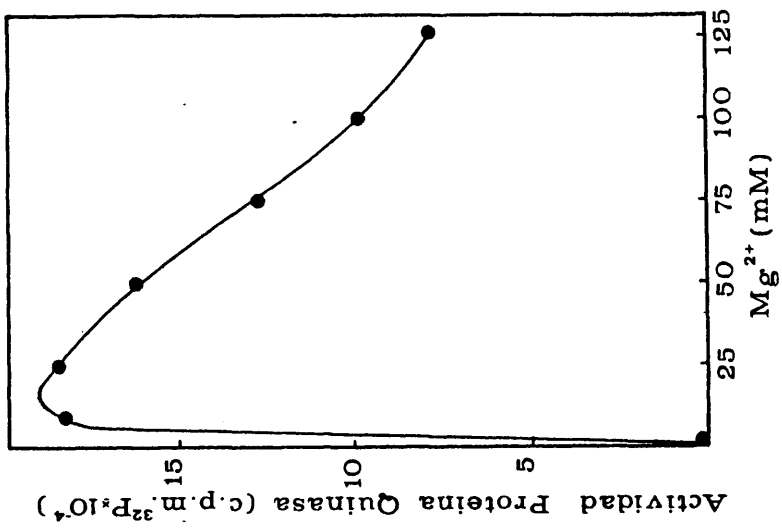


FIG. 68. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima PQI-2 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

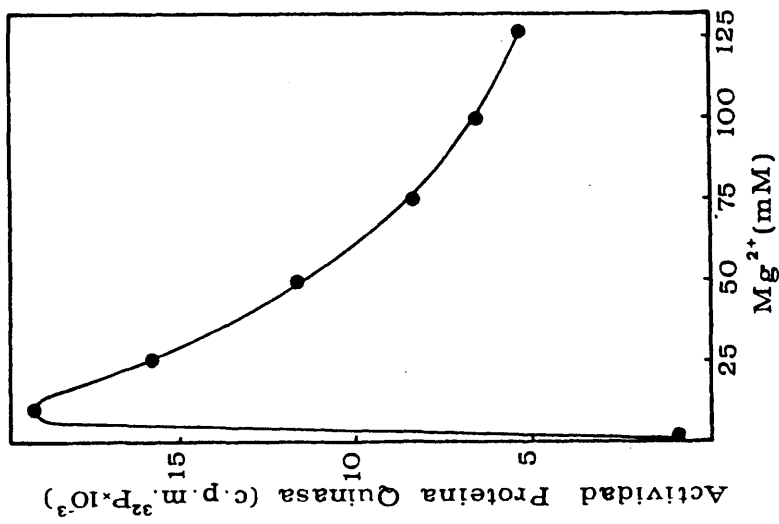


FIG. 67. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima PQI-1 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

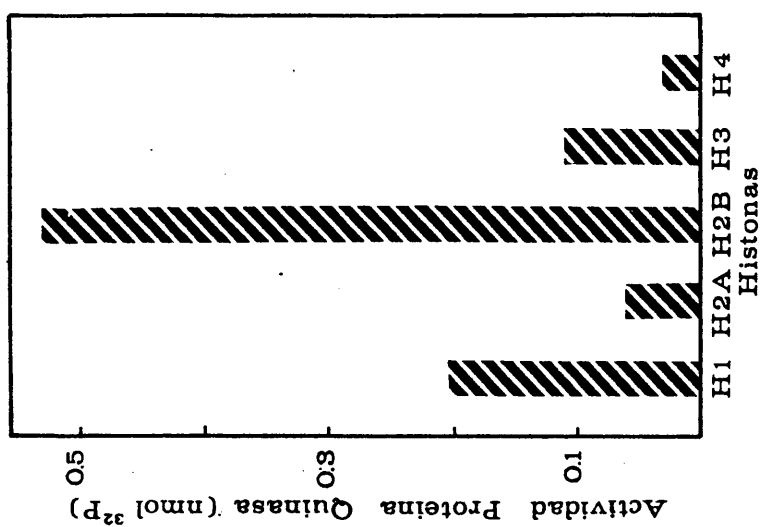


FIG. 70.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas por la enzima POK-2 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos)

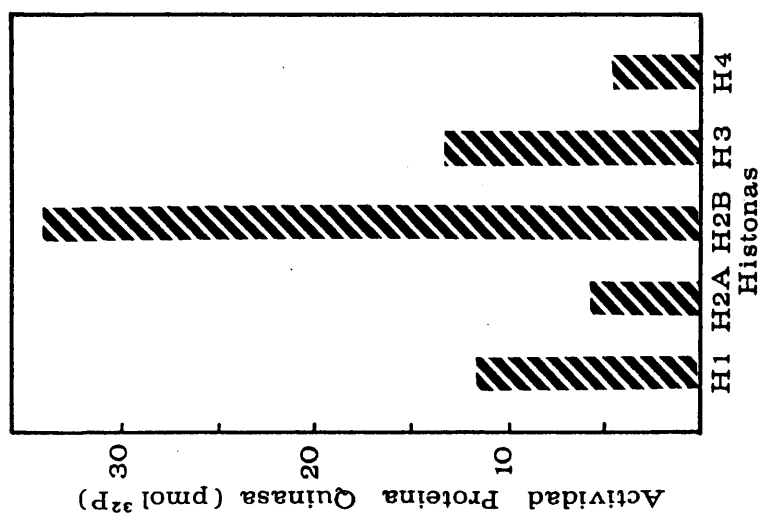


FIG. 69.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas por la enzima POK-1 (ensayo de actividad en ausencia de nucleótidos cíclicos).

cada inhibición a altas concentraciones, como ocurre con la enzima PQA-2 (FIG 34B) y se ha descrito para las proteína quinasas dependientes de cAMP. Este último efecto es más pronunciado para Pqi-1 que para Pqi-2.

Respecto a la posible relación de Pqi-1 con PQG, Inoue y col (204), han descrito que en contraste con la PQG nativa de pupa de Bombyx mori que requiere elevadas concentraciones de Mg^{2+} (100 mM), la actividad quinásica independiente de cGMP obtenida -- por proteólisis limitada, alcanza el máximo a bajas concentraciones del catión divalente.

3.5.3.2. Proteínas sustratos.

Las FIG 69 y 70 corresponden a la fosforilación de distintas fracciones de histona por Pqi-1 y Pqi-2, respectivamente. La especificidad de ambas enzimas por estos sustratos es similar/ siendo la fracción H2B la mejor fosforilada como ocurre con PQA-1 (FIG 43), PQA-2 (FIG 44) y PQG (FIG 56). La única diferencia es-- triba en la preferencia de Pqi-1 por la histona H3 (rica en arginina) en comparación con Pqi-2.

3.6. Proteína quinasas asociadas a fracción particulada.

La actividad quinásica de los preparados de membranas -- (ESQUEMA 4) o de las fracciones parcialmente purificadas obteni-- das a partir de los mismos exhibe dependencia de cAMP.

3.6.1. Distribución de la actividad quinásica asociada a fracción particulada.

En la TABLA IX se muestra la distribución de las actividades de proteína quinasa, en presencia de cAMP, de los distintos preparados de fracción particulada obtenidos como se indica en el apartado 2.8.1, así como las actividades inhibidora de proteína quinasa y quinásica corregida en función de la inhibición resultante, de dichos preparados. La actividad específica disminuye a medida que aumenta la molaridad del gradiente de sacarosa y por tanto, para ensayar con preparados más enriquecidos en proteína quinasa, puede ser interesante la obtención de las fracciones correspondientes a las molaridades más bajas. Son de destacar, además, las elevadas actividades inhibidoras asociadas a fracción particulada y la importante actividad quinásica del preparado SED 2.

3.6.2. Aislamiento y purificación de las proteínas quinasas asociadas a membranas (PQM).

La FIG 71 corresponde al perfil de actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en DEAE-celulosa el preparado solubilizado de membranas. Teniendo en cuenta la anchura del máximo y la amplitud del gradiente utilizado, no se puede descartar la existencia de dos o más actividades como ocurre en fracción soluble.

En la FIG 72 se representa la actividad quinásica del eluido resultante de cromatografiar en Ultrogel AcA 22 el preparado obtenido al mezclar y concentrar las fracciones con actividad/

TABLA IX
Distribución de la actividad de proteína quinasa asociada a fracción particulada

MUESTRA	Prot. total (mg)	Inhibición/50 μ l (%)	32 P/ 50 μ l cpm	32 P/ 50 μ l cpm	(1) 32 P/ 50 μ l cpm	Act. específica 32 P/min-mg [pmol 32 P/min-mg]	Act. total 32 P/min [pmol 32 P/min]
SED 2	58.0	75.0	3167	12719	16.1	931.5	
SED 3	126.0	58.8	3333	8094	4.2	533.0	
PREP A (0.0-50 M)	—	33.9	3552	5372	—	—	
PREP B (0.50-0.75 M)	0.4	27.3	6175	8493	622.1	248.8	
PREP C (0.75-1.00 M)	4.0	45.7	6648	12236	89.6	358.5	
PREP D (1.00-1.25 M)	11.2	83.4	3711	22328	58.4	654.2	
PREP E (1.25-1.50 M)	8.8	79.1	2912	13913	46.3	407.6	
PREP F	18.4	68.3	4295	13540	21.6	396.7	

(1) Considerando la actividad inhibidora.

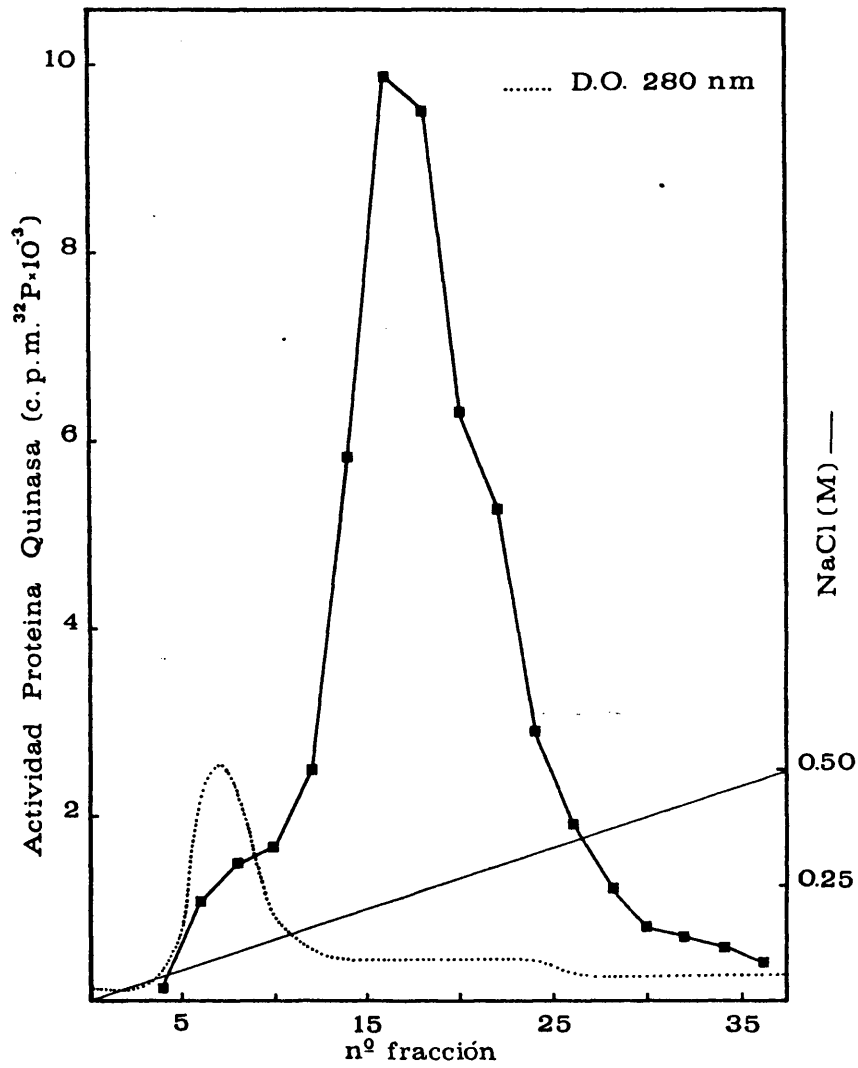


FIG. 71.- Perfil del eluido de la cromatografía en DEAE-celulosa del preparado solubilizado de membranas (ensayo de actividad en presencia de c AMP).

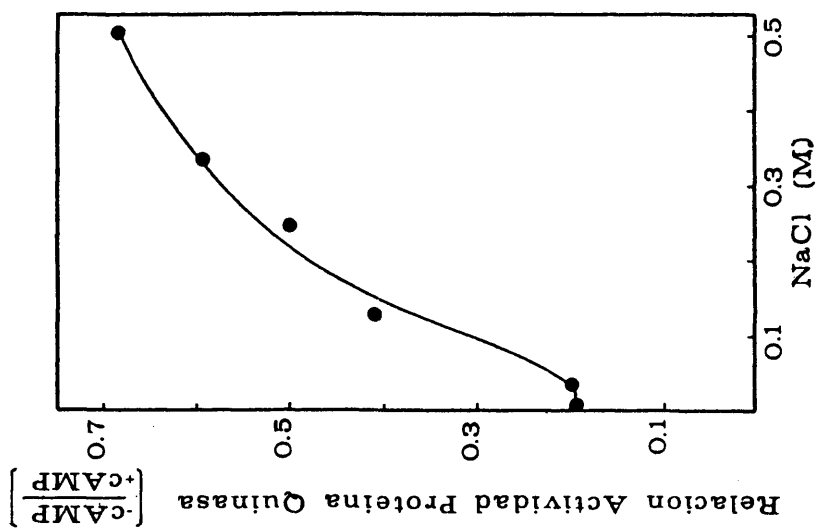


FIG. 73. Efecto de la fuerza iónica sobre la activación de la proteína quinasa asociada a membranas.

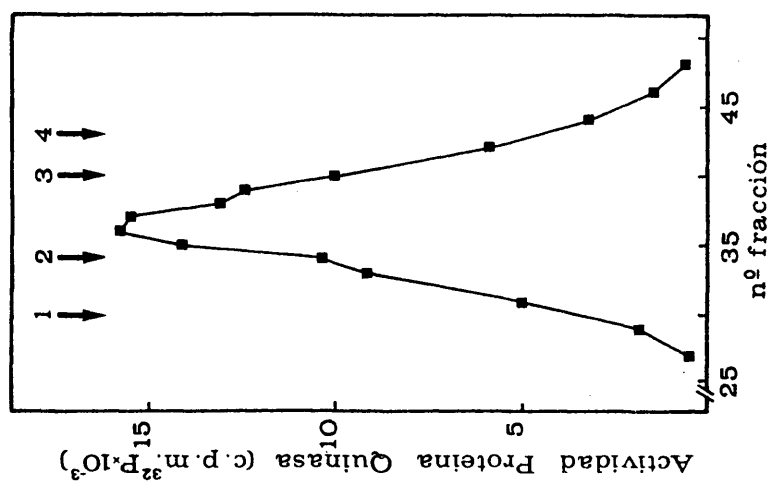


FIG. 72. Perfil del eluido de la cromatografía en Ultragel Aca 22 de la actividad de proteína quinasa solubilizada de membranas. Los números corresponden a los máximos de las proteínas indicadas en el texto (ensayo de actividad en presencia de cAMP).

quinásica procedentes de DEAE-celulosa (los números corresponden a las proteínas indicadas en el apartado 2.8.2.5). El peso molecular de la enzima solubilizada de membranas es superior a -- 300.000 D, valor extremadamente alto que se puede deber a la formación de algún agregado originado por el cambio de entorno de la enzima o por su asociación con proteínas intrínsecas de la membrana. Dreyfuss y col (339) han encontrado que cuando la enzima asociada a membrana de eritrocito se extrae con detergente (Triton X-100) eluye en Sephacryl S-200 con el volumen de exclusión ($M \geq 500.000$ D), mientras que cuando se extrae mediante tratamiento hipotónico el peso molecular obtenido es de 170.000 D. Estos resultados sugieren que la holoenzima obtenida solubilizando con detergente puede estar asociada con alguna proteína intrínseca de membrana.

3.6.3. Caracterización enzimática.

Se utiliza el preparado de membranas obtenido según se indica en el ESQUEMA 4 para la detección de la fosforilación endógena y la determinación del efecto del NaCl sobre la activación de la enzima. Para la fosforilación de diversos sustratos y el estudio del efecto de distintos cationes divalentes, se emplea la enzima solubilizada obtenida de la cromatografía en DEAE-celulosa (ESQUEMA 5).

3.6.3.1. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad y disociación de la enzima.

En la FIG 73 se muestra el aumento de la relación de actividad (-cAMP/+ cAMP) por efecto del aumento de la concentra-

ción de NaCl en el medio de incubación como ocurre con la enzima PQA-2 (FIG 39) y que se corresponde con una acentuada inhibición de la actividad enzimática de forma similar a lo que sucede con las proteína quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble - (FIG 36 y 37). Teniendo en cuenta que se utiliza un preparado - bruto de membranas, una contribución parcial al aumento de la relación de actividad que se muestra en la FIG 73 podría venir proporcionado por la activación de alguna actividad de proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos presente en estos preparados.

3.6.3.2. Efecto de distintos cationes divalentes.

En la TABLA X se muestra el efecto de distintos cationes divalentes sobre la actividad de proteína quinasa asociada a membranas que resulta en conjunto muy similar al obtenido para PQA-2 (TABLA VI). La enzima requiere catión divalente para su actividad y el Mg^{2+} es el más eficaz en este sentido. De los restantes cationes divalentes, sólo el Co^{2+} activa la enzima aunque en mucha menor proporción que el Mg^{2+} .

Se puede concluir que para las proteína quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos del insecto, el Co^{2+} es el catión que más activa la enzima después del Mg^{2+} , mientras que el Mn^{2+} tiene menor efecto (PQG, TABLA VII) o carece de él (PQA-2, TABLA VI). En la TABLA X también se aprecia el efecto inhibitor de Ca^{2+} y Zn^{2+} , más acentuado para este último catión, como ocurre con PQA-2 (FIG 34).

En la FIG 74 se representa la variación de la activi--

dad quinásica asociada a membranas en función de la concentración de Mg^{2+} en el ensayo, cuyo valor óptimo se sitúa alrededor de 10 mM. Altas concentraciones inhiben y el perfil resultante es similar al de la FIG 35B correspondiente a PQA-2. A pesar de la poca diferencia existente entre la actividad enzimática en presencia/ de cAMP y cGMP, el efecto de la concentración de Mg^{2+} , típico de/ las proteína quinasas dependientes de cAMP, indica que en caso - de existir un componente dependiente de cGMP en membranas, su - contribución es muy minoritaria.

T A B L A X

Efecto de distintos cationes divalentes sobre la actividad enzimática de proteína quinasa dependiente de cAMP asociada a membranas (PQM).

<u>Actividad de proteína quinasa (cpm ^{32}P)</u>		
<u>Catión divalente (10 mM)</u>	<u>Control</u>	<u>+ cAMP</u>
Ninguno	1398	1590
Ca^{2+}	355	408
Co^{2+}	558	3894
Cu^{2+}	361	375
Mg^{2+}	11950	35556
Mn^{2+}	406	633
Zn^{2+}	229	234
$Mg^{2+} + Ca^{2+}$	496	4426
$Mg^{2+} + Zn^{2+}$	343	529

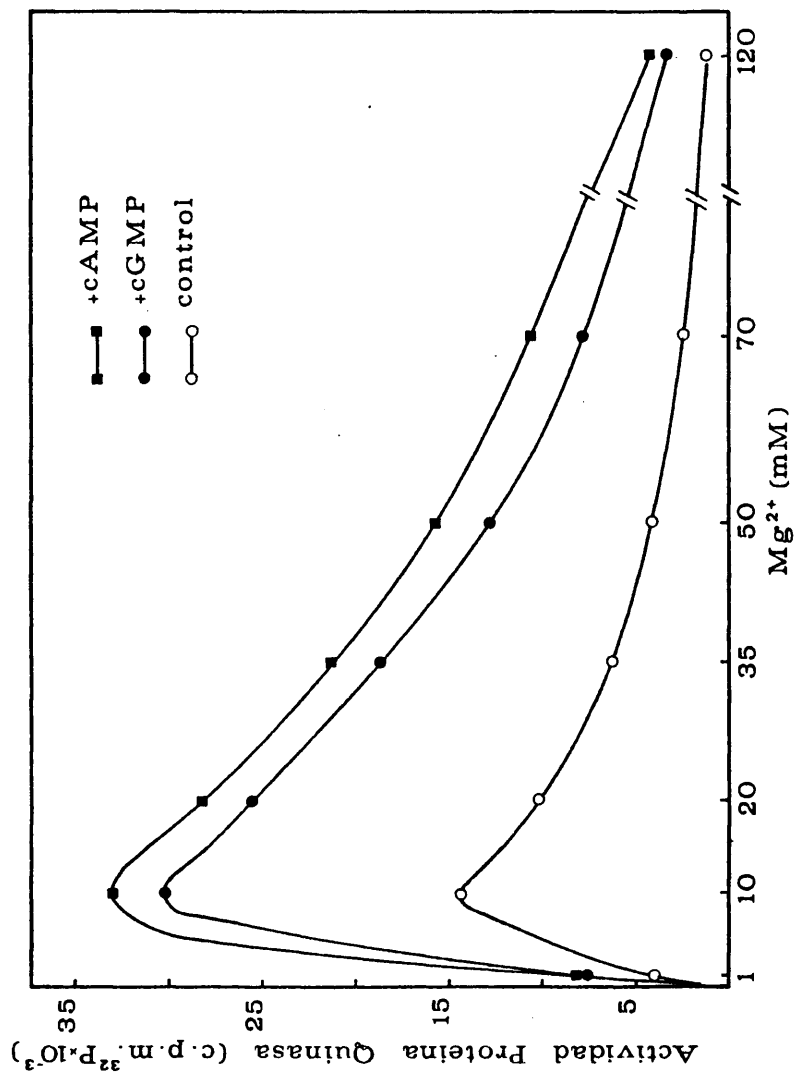


FIG.74.- Efecto de la concentración de Mg²⁺ sobre la actividad de la proteína quinasa asociada a membranas.

3.6.3.3. Proteínas sustratos.

En la FIG 75 se representa la fosforilación de distintas fracciones de histona y de la protamina por la(s) proteína(s) quinasa(s) asociada(s) a membranas. La preferencia de la enzima/por estos sustratos es muy similar a la que tiene PQA-1 (FIG 43) y parecida en terminos generales a la de los demás componentes - del sistema proteína quinasa, resultando ser la fracción H2B la mejor fosforilada por la enzima. Son de destacar los elevados niveles de actividad basal observados con todos los sustratos, como ocurre con PQA-1 (FIG 43) y la poca selectividad por el nucleotido cíclico como se ha mencionado anteriormente.

3.6.3.4. Fosforilación endógena.

Cuando se ensaya la actividad quinásica de un preparado de membranas (200 μ g de proteína), en ausencia de histona, se detecta una incorporación endógena de ^{32}P independientemente de cAMP, de aproximadamente 0.5 pmol ^{32}P /min.mg (2.200 cpm de ^{32}P - en 10 min con una actividad total de 225.000 cpm). Para la medida de esta fosforilación endógena se utiliza una modificación del procesado (339). Una vez añadido el TCA se centrifuga a 4500 g - durante 10 min y el precipitado obtenido se redisuelve con 200 μ l de NaOH 1N; se precipita de nuevo con TCA y se repite la operación descartando el sobrenadante. Para la medida de la radiactividad del precipitado se procede como se indica en el apartado 2.2.1. La incorporación de ^{32}P obtenida con el procesado convencional es prácticamente la misma que con esta modificación.

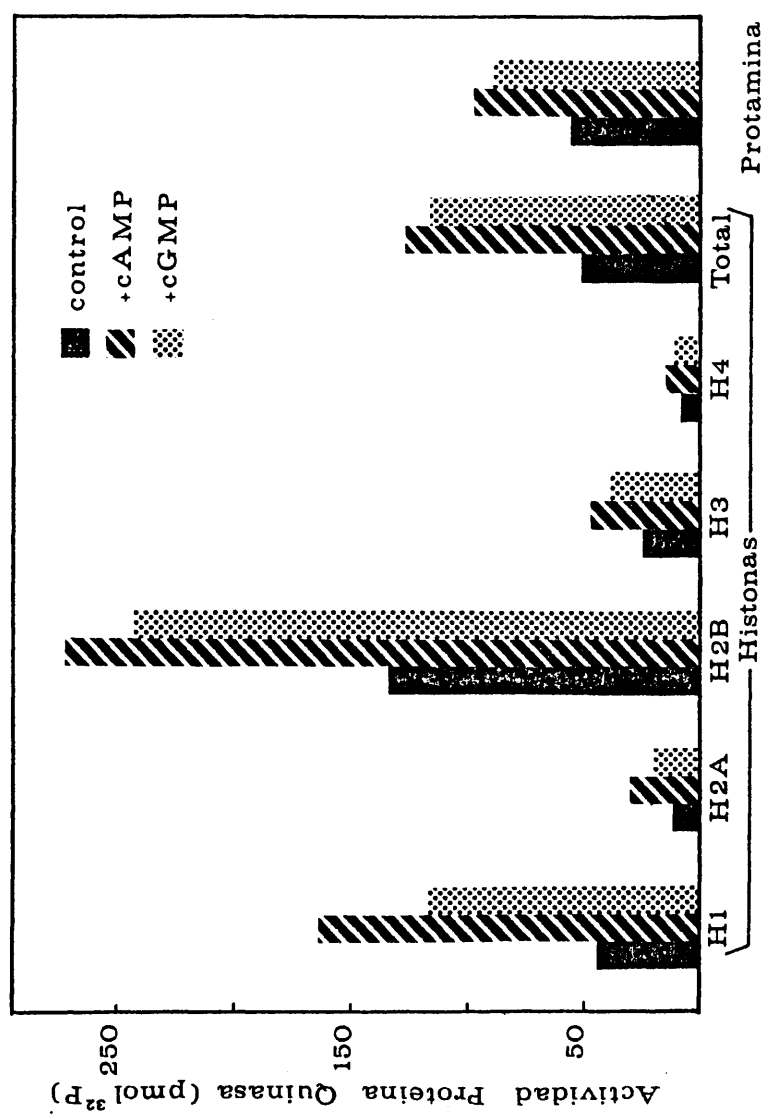


FIG. 75.- Fosforilación de diversas fracciones de histonas y de protamina por la proteína quinasa asociada a membranas.

TABLA XI

Actividad de proteína quinasa de los distintos preparados obtenidos mediante choque osmótico hipotónico de la fracción de membranas

MUESTRA	Prot. total (mg)	Nucleótido cíclico	^{32}P cpm	Activac. (%)	Act. total $^{32}\text{P} \times 10^{-5}$ (cpm)	Rendimiento (%)	Activ. esp. (pmol / min-mg)	Purificación
			1948	—	2.74	100.0	4.50	1.00
SUSP. A	22.4	cAMP	5343	2.7	7.53	100.0	2.35	1.00
		cGMP	1818	0.0	2.56	100.0	4.20	1.00
SUSP. B	6.4	—	3234	—	5.06	184.7	29.07	6.46
		cAMP	20668	6.4	32.34	429.5	185.76	15.04
		cGMP	6645	2.0	10.24	400.0	58.83	14.00
SOLUB.	7.9	—	814	—	11.30	412.4	52.50	11.67
		cAMP	5241	7.7	86.61	1150.2	402.54	32.59
		cGMP	2640	3.2	36.63	1430.9	170.28	40.54
STE 1U	5.8	—	13246	—	59.61	2175.5	374.60	83.24
		cAMP	108100	8.2	486.45	6460.2	3057.13	247.54
		cGMP	43695	3.3	196.63	7680.9	1235.72	294.22
STE 2U	0.5	—	1377	—	6.06	221.2	421.87	93.75
		cAMP	7257	5.3	31.93	424.0	2223.34	180.03
		cGMP	3125	2.3	13.75	537.0	957.41	227.95

3.6.4. Separación de dos actividades de proteína quinasa dependientes de cAMP asociadas a membranas mediante choque osmótico.

En la TABLA XI se encuentran las actividades enzimáticas de los distintos preparados obtenidos en la experimentación/ que se detalla en el ESQUEMA 6. Hay una considerable ganancia - tanto de actividad total como de actividad específica como consecuencia del choque osmótico. La actividad que se extrae por este procedimiento (que se encuentra fundamentalmente en el STE 1U y/ en menor proporción en el STE 2U), correspondería a una proteína quinasa asociada a membranas que al separarse de su estructura,/ quedaría fuera del control de un inhibidor asociado a las mismas. Así, en experimentos similares en los que se mide la actividad - quinásica de la suspensión B, del STE 1U y de una mezcla de ambos se observa una gran inhibición por parte del preparado de membranas (TABLA XII), lo que indica que gran parte de la actividad inhibidora permanece asociada a las membranas después del choque - osmótico.

T A B L A X I I

<u>Actividad de proteína quinasa de distintos preparados obtenidos mediante choque osmótico hipotónico de membranas.</u>	
<u>Preparado enzimático (vol/ensayo)</u>	<u>Actividad de proteína quinasa (cpm ³²P)</u>
Suspensión B (50 µl)	16030
STE 1U (50 µl)	104383
Suspensión (50 µl) + STE 1U (50 µl)	22275

El aumento de actividad total y específica con la solu bilización de la suspensión B (TABLA XI) vendría a indicar que - la actividad quinásica que permanece en las membranas después del choque osmótico está intrínsecamente asociada a su estructura y/ que al liberarse de la misma, se facilita la fosforilación de - sustratos exógenos. Para diferenciar las dos actividades quinási cas asociadas a membranas, se denomina PQM-2 la que se extrae me diante choque osmótico y PQM-1 la que permanece asociada a las - membranas después del mismo y se solubiliza con detergentes. No/ se pueden hacer cálculos acerca de la proporción de una y otra - enzima puesto que aunque según los datos de la TABLA XI la acti- vidad total correspondiente a PQM-2 es aproximadamente 6 veces - mayor a la de PQM-1 solubilizada, la presencia del inhibidor po- dría, evidentemente, alterar esta relación.

El choque osmótico altera las propiedades de sedimenta ción del preparado de membranas que permanece parcialmente en - suspensión después de centrifugar a 37.000 g y cuya sedimentación total únicamente se consigue mediante ultracentrifugación. Si se/ aumenta la fuerza iónica del preparado de membranas resuspendidas en agua destilada después del choque osmótico, mediante la adi--- ción de una punta de NaCl o diluyendo simplemente con tampón D se recuperan las propiedades de sedimentación iniciales sin que con ello se perturbe la extracción de la proteína quinasa asociada a membranas, permitiendo además prescindir de la ultracentrifuga--- ción. El NaCl añadido se elimina mediante diálisis.

Los porcentajes de activación reflejados en la TABLA - XI deben ser considerados solo de un modo indicativo teniendo en cuenta la gran influencia que tiene sobre este factor la concen-

tración de proteínas. Así, por ejemplo, el preparado solubilizado concentrado frente a polietilenglicol exhibe una activación - de 11.5 veces, mientras que la del preparado inicial, es de sólo 7.7 veces (TABLA XI).

Los materiales biológicos más utilizados en el estudio de las proteína quinasas asociadas a membranas han sido las membranas de eritrocitos y las sinápticas. En la mayoría de los casos los estudios se llevan a cabo con la membrana intacta y cuando se extrae la enzima, el procedimiento más utilizado es la solubilización con detergentes principalmente Triton X-100 y Lubrol.

Se ha visto también que la holoenzima puede ser liberada intacta de la membrana de eritrocitos, con altos rendimientos, mediante un tratamiento hipotónico a pH alcalino; con EDTA 1mM - conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM y ajustado el pH a 9.0 con -- NH_4OH (341) o con EDTA 0.1 mM ajustado el pH a 9.0 con NaOH (339). Este tratamiento es similar al choque hipotónico utilizado para extraer la PQM-2 de Ceratitidis capitata. Se ha sugerido que las - proteína quinasas liberadas mediante choques hipotónicos no son/ proteínas intrínsecas de membrana, sino que están asociadas a - ella probablemente a través de interacciones hidrofóbicas con proteínas intrínsecas de membrana (339).

Otra forma de extraer las proteína quinasas de las membranas es mediante tratamiento iónico a una determinada concentración salina. Hosey y Tao (249 y 342) extraen las proteína - quinasas de membrana de eritrocitos con NaCl 0.5 M. Ueda y col - (343) extraen la proteína quinasade fracciones de membrana sináptica con 0.1 M de NH_4Cl . La enzima obtenida por Sacktor y col -

(336) de membranas de vellosidades renales con NH_4Cl 1M difiere - en su comportamiento cromatográfico respecto a la enzima obtenida por solubilización con Lubrol.

Jergil y Ohlsson (344) dividen las proteína quinasas de retículo endoplásmico en dos clases; las que pueden ser extraídas mediante tratamiento iónico (tampón conteniendo KCl 0.3M) y las - que por estar más firmemente unidas tan solo se solubilizan por - detergentes (Triton X-100). La recuperación que obtienen de una - y otra actividad por el tratamiento salino y con detergentes es - superior al total presente en la membrana intacta tal como sucede en nuestro caso, hecho este que se ha interpretado en el sentido/ de un enmascaramiento parcial de la actividad por la asociación - con la membrana. La proteína quinasa extraída por el tratamiento/ salino muestra diferentes propiedades cromatográficas que las de/ la fracción soluble y la que precisa detergente para su solubili- zación, lo que hace descartar, en principio, la posibilidad de/ que esta enzima proceda del citosol por unión inespecífica a la - membrana.

3.6.5. Caracterización enzimática diferencial de PQM-1 y PQM-2.

Una de las primeras cuestiones a determinar es la rela- ción existente entre las dos proteína quinasas de membrana y su - posible conexión con las enzimas presentes en el citosol. No está clara la relación entre las proteína quinasas solubles y asocia- das a membrana. La caracterización de ambos tipos de enzimas en - cerebro , corazón, hígado y músculo bovino ha llevado a la conclu- sión de que las enzimas de membrana son muy similares en los dife- rentes tejidos pero distintas de las enzimas del citosol (107). -

La proteína quinasa purificada de membranas cerebrales es electroforética, inmunológica y catalíticamente distinta a la enzima del citosol (60). Estudios de recombinación de subunidades también indican que la proteína quinasa de membrana difiere marcadamente de las enzimas solubles. Así, la subunidad reguladora de la proteína quinasa de membrana no inhibe la subunidad catalítica de la enzima soluble, ni la subunidad reguladora de esta última inhibe la subunidad catalítica de la proteína quinasa de membrana (60). La actividad quinásica dependiente de cAMP del sedimento resultante de centrifugar a 105.000 g el homogeneizado del sistema nervioso del lepidóptero Manduca sexta y solubilizada con Triton X-100, -- exhibe un perfil de activación por nucleótidos cíclicos distinto del de la proteína quinasa de fracción soluble (299).

Otros autores encuentran marcadas similitudes entre las proteínas quinasas de membrana y citosol sugiriendo que se trata de la misma enzima (345 y 346). En células de músculo liso de útero, el tratamiento con isoproterenol, agonista β -adrenérgico, promueve la asociación de la proteína quinasa soluble a la membrana celular (149,347). Esta translocación de la enzima inducida hormonalmente apoya la identidad de la proteína quinasa de membrana y citosol en algunos tejidos. La resistencia a la extracción salina y a la proteólisis, así como la necesidad de detergentes para la solubilización de la enzima translocada, sugieren que la enzima soluble llega a integrarse en la membrana (348).

Para determinar si existen diferencias entre PQM-1 y -- PQM-2 y establecer su relación con las enzimas de fracción soluble se procede al cálculo de Km para histona y ATP y Ka (concentración de nucleótido cíclico necesaria para la mitad de la acti-

vación máxima) para cAMP y cGMP de ambas enzimas. Se utiliza el/ preparado enzimático solubilizado de PQM-1 y el STE 1U de PQM-2.

3.6.5.1. Cálculo de K_m para el ATP.

En las FIG 76A y 76B se muestran las representaciones/ de Lineweaver - Burk del efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de PQM-1 y PQM-2. Se aprecia una clara diferencia - entre ambas enzimas en cuanto a la afinidad por ATP con valores/ de K_m ap de aproximadamente $10 \mu M$ y $4 \mu M$ para PQM-1 y PQM-2, respectivamente, resultando este último muy similar al valor de K_m / para ATP de PQA-2 (FIG 47).

3.6.5.2. Cálculo de K_m para la histona.

En las FIG 77A y 78A se representa el aumento de la incorporación de ^{32}P catalizada por PQM-1 y PQM-2, respectivamente, conforme se incrementa la concentración de histona (fracción total) en el ensayo de actividad. En las FIG 77B y 78B se muestran las representaciones de Lineweaver - Burk para la obtención de los valores de K_m ap para este sustrato que son 1.5 mg/ml y 0.25 mg/ml para PQM-1 y PQM-2, respectivamente, este último idéntico al valor de K_m ap para histona de PQA-2.

3.6.5.3. Activación por nucleótidos cíclicos.

En las FIG 79A y 79B se representa la variación de la - actividad de PQM-1 y PQM-2, respectivamente, en función de la concentración de cAMP y cGMP. El valor de K_a para cGMP es idéntico - en ambos casos (aproximadamente $0.44 \mu M$), mientras que el valor -

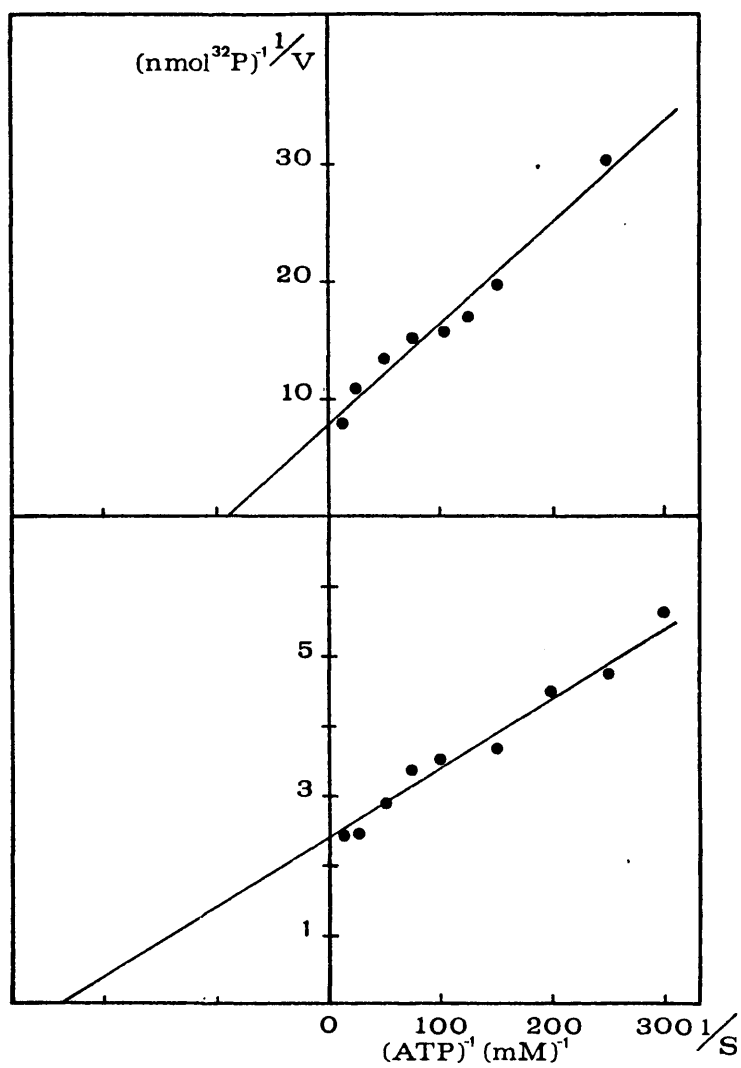


FIG. 76.- Representaciones de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de las enzimas PQM-1 (A) y PQM-2 (B) frente a ATP en presencia de cAMP.

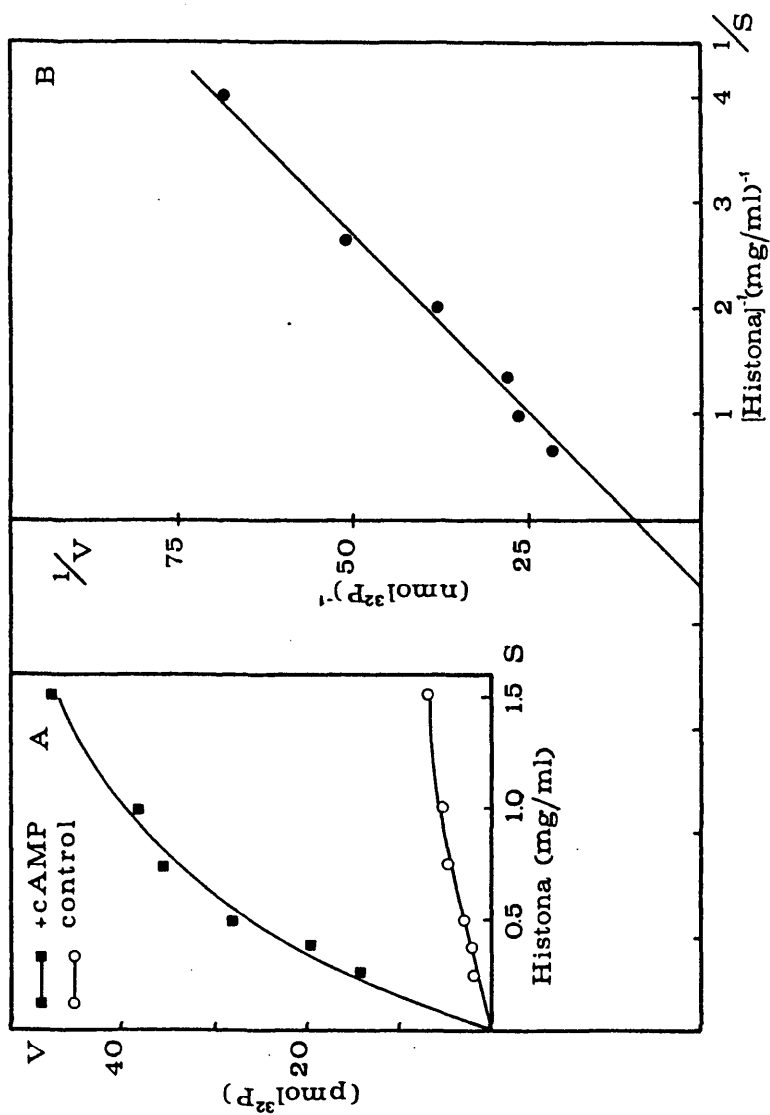


FIG. 77.- (A) Efecto de la concentración de histonas (fracción total) sobre la actividad de proteína quinasa de la enzima PQM-1. (B) Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de la enzima PQM-1 frente a histonas (fracción total), en presencia de cAMP.

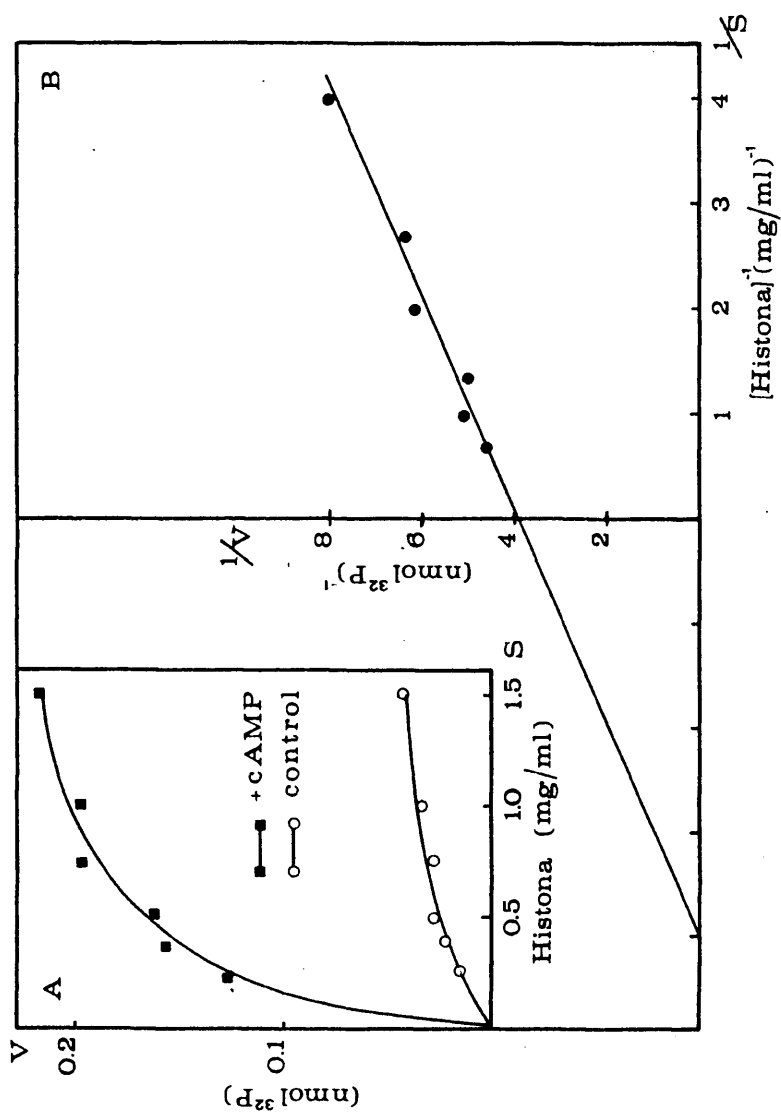


FIG. 78. (A) Efecto de la concentración de histonas (fracción total) sobre la actividad de proteína quinasa de la enzima POM-2. (B) Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de proteína quinasa de la enzima POM-2 frente a histonas (fracción total), en presencia de cAMP.

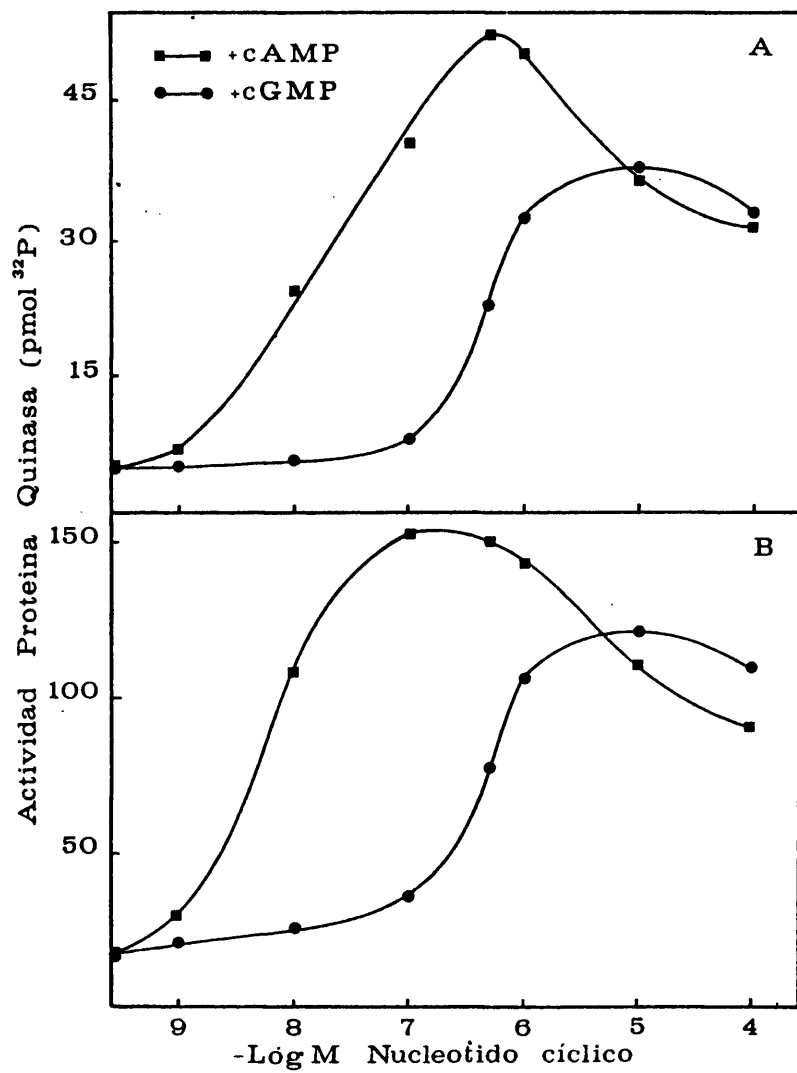


FIG. 79.- Efecto de la concentración de cAMP y cGMP sobre la actividad de las enzimas PQM-1 (A) y PQM-2 (B).

de K_a para el cAMP de PQM-1 (aproximadamente 21 μ M) es algo más elevado que el de PQM-2 (aproximadamente 6 nM).

Los resultados obtenidos de esta caracterización cinética sugieren que si bien la enzima PQM-1 parece tener entidad de proteína quinasa de membrana, PQM-2 podría tratarse de la enzima PQA-2 translocada de fracción soluble. Aunque el significado fisiológico de estas translocaciones no está claro puesto que la disociación de PQA de fracción soluble puede resultar en una asociación artefactual de la subunidad catalítica, C, a la fracción particulada (149,349), trabajos recientes en células de musculatura lisa de útero (348) sugieren que la translocación inducida hormonalmente de la proteína quinasa, es un importante mecanismo por el cual la actividad de la enzima se incrementa en la vecindad de sus sustratos "in situ", asignando a las enzimas de fracción soluble el papel de precursores de las proteínas quinasas asociadas a membranas (348).

2.6.6. Conservación.

Una característica peculiar del sistema proteína quinasa de membranas respecto al de fracción soluble es la posibilidad de conservar cualquiera de los preparados obtenidos (suspensión A, suspensión B, STE 1U, eluidos de columnas cromatográficas) a -70° C, sin necesidad de adicionar albúmina u otros agentes estabilizadores. La liofilización, al igual que ocurre con las proteínas quinasas del citosol, conlleva una pérdida total de la actividad.

3.7. Proteína ligante de cAMP (PL).

Los ensayos de actividad ligante de cAMP se realizan - según el método B (tampón acetato, pH 4.5)

3.7.1. Aislamiento y purificación.

En la FIG 80 se representa el perfil de actividad ligante de cAMP del eluido resultante de cromatografiar en hidroxipatito el sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de cabezas de insecto adulto. Se aprecian tres máximos de actividad, el primero de los cuales es mayoritario (contrariamente a los resultados representados en la FIG 17) y carece de actividad quinásica, y los otros dos se corresponden con las actividades ligantes de cAMP de PQA-1 y PQA-2. Un perfil similar de actividad quinásica-ligante de cAMP se obtiene al cromatografiar en hidroxipatito un sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de corazón de conejo, indicando una distribución similar de este sistema enzimático en el díptero y en mamíferos.

En la FIG 81 se muestra la actividad quinásica del -- eluido de la cromatografía en Sephadex G-200 del preparado resultante de concentrar las fracciones correspondientes al primer pico de actividad ligante de cAMP obtenido de hidroxipatito. En la FIG 82 se comparan los volúmenes de elución en Sephadex G-200 de las formas nativa y agregada de PQA-2 (FIG 82A) y de las proteínas ligantes de cAMP obtenidas de cabeza de insecto adulto y/larva (FIG 82B). El tamaño molecular de la PL de cabeza de insecto adulto es similar o algo menor al de la forma nativa de PQA-2. Por otra parte, los volúmenes de elución de PL de cabezas de --

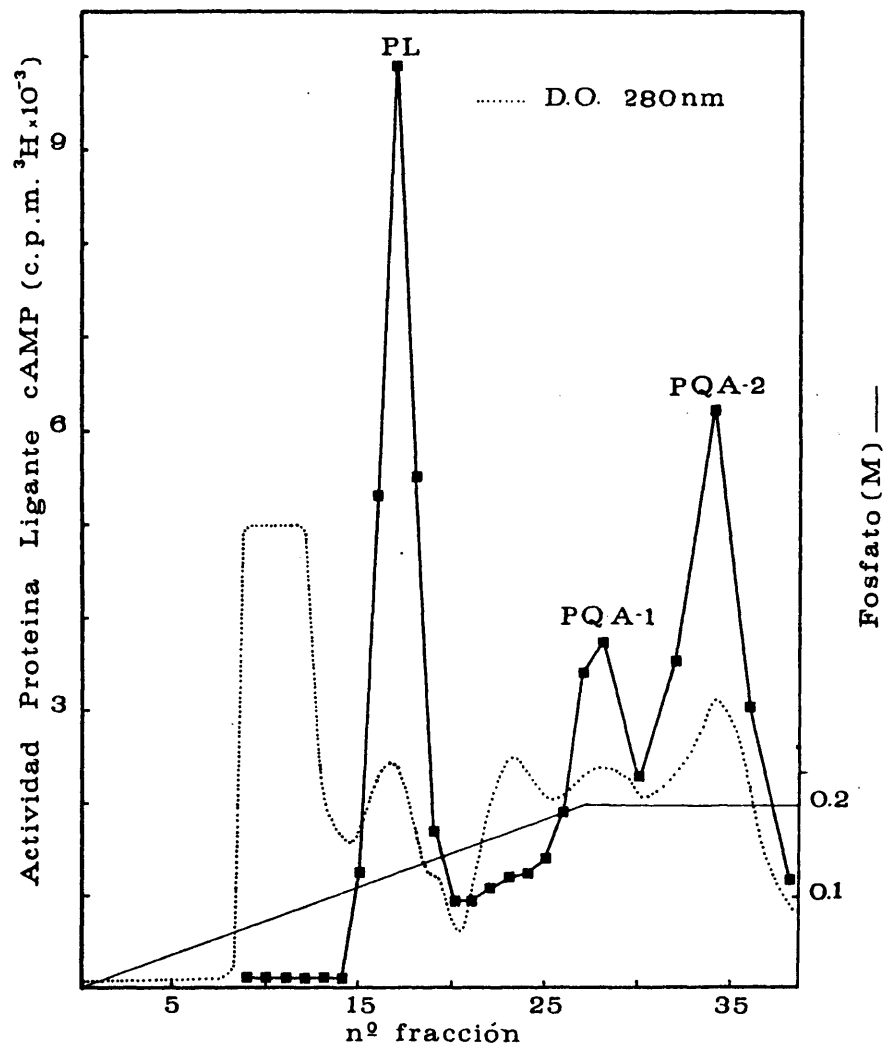


FIG. 80.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxiapatito del sobrenadante de centrifugación, obtenido a partir de cabezas de insecto adulto.

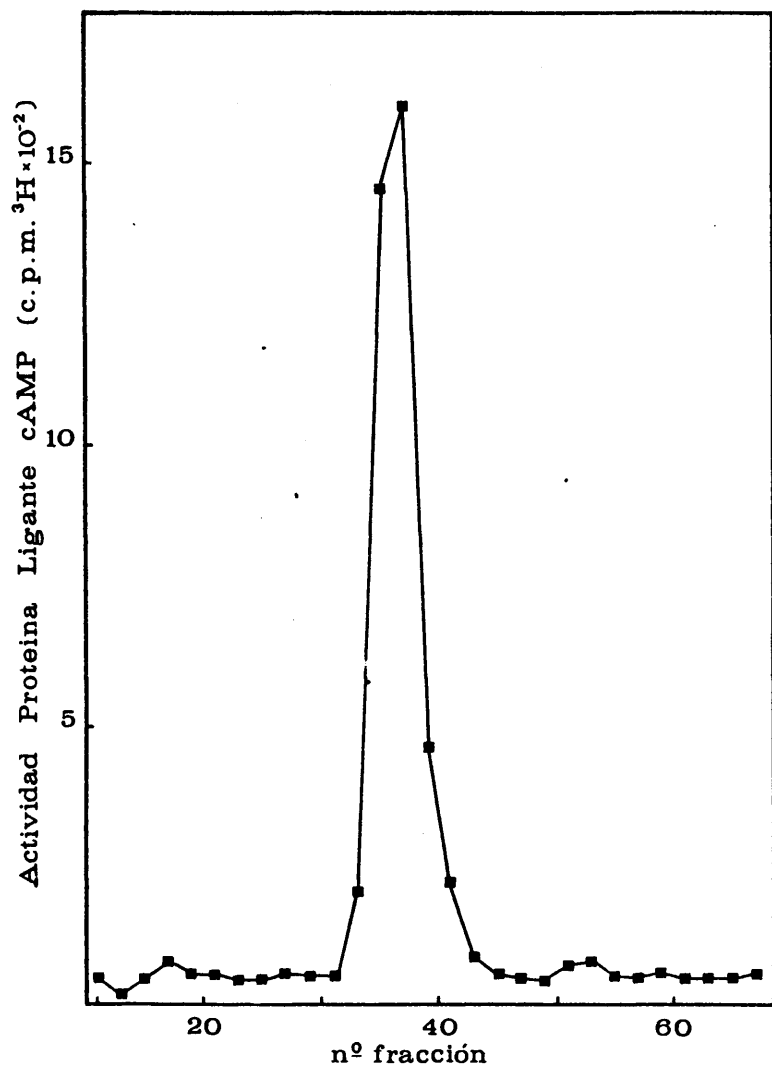


FIG. 81.- Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-200 de la enzima PL.

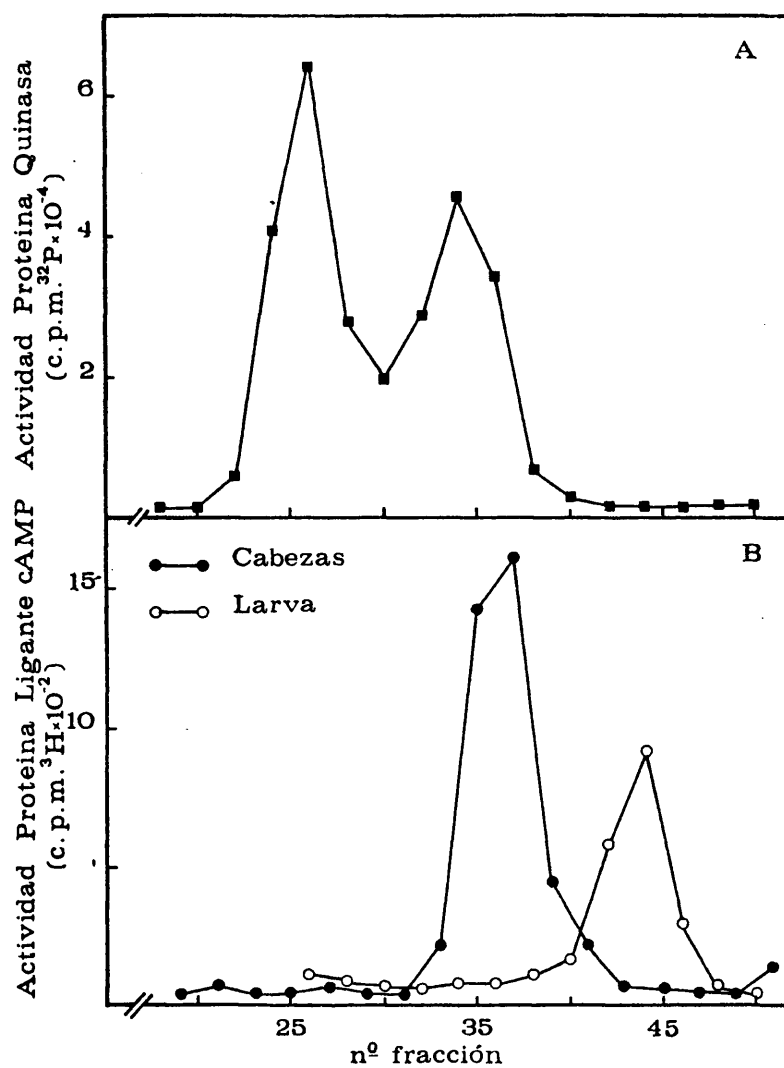


FIG.82.- Perfiles de los eluidos de las cromatografías en Sephadex G-200 de la enzima PQA-2 (ensayo de actividad en presencia de cAMP)(A) y de la enzima PL (B) obtenida de cabeza de insecto adulto y larva.

insecto adulto y PQI-2 en cromatografías en Sephadex G-100 son muy similares (no se muestran los datos). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que PQI-1, PQG y PL de cabezas de adulto tienen un tamaño molecular similar al de PQA-2 (30.000 D, FIG 33).

El volumen de elución en Sephadex G-200 de la PL obtenida de larva de seis días (FIG 82B) indica que esta enzima tiene un tamaño considerablemente menor que el de la PL de cabezas de insecto adulto. Comparando las FIG 62 y 82 y teniendo en cuenta los perfiles de las cromatografías en Sephadex G-100 de la PL de cabezas de adulto, se puede asignar a la enzima de larva un tamaño similar a PQI-2. En la FIG 82B se aprecia también que el nivel de PL en larva es considerablemente menor que en cabeza de adulto, como ya se había puesto de manifiesto en los experimentos preliminares. En estos, se había observado también que la PQA de larva no parecía presentar tendencia a la agregación, habiéndose detectado tan sólo la forma de menor peso molecular (FIG 18). Se podría establecer una correlación entre las proteínas ligantes de cAMP de larva y cabeza de insecto adulto en el sentido de que esta última se presentase bajo la forma de un agregado de aquella y que ambas estuvieran relacionadas con el sistema proteína quinasa.

3.7.2. Conservación.

Contrariamente a lo que ocurre con las proteínas quinasas de fracción soluble, los preparados de proteína ligante de cAMP obtenidos de hidroxipatito o Sephadex se pueden conservar a -70° C durante varias semanas sin modificación sensible de la/

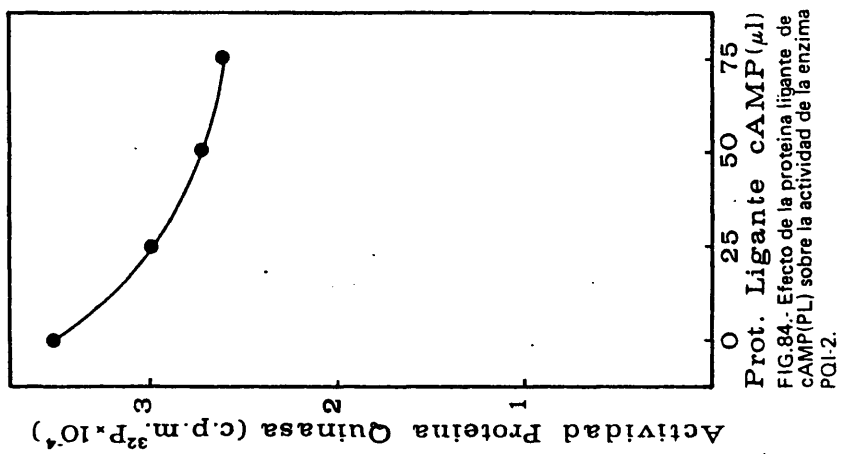
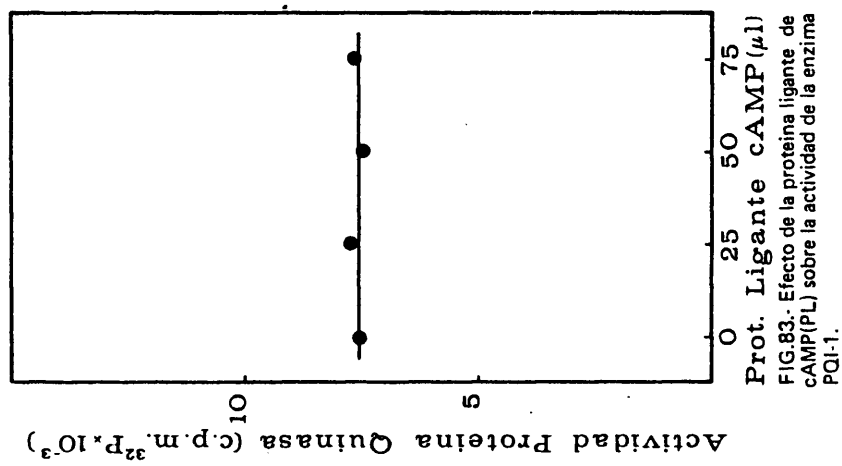
actividad y sin que para ello se precise la adición de ningún agente estabilizador.

3.7.3. Interacción de la proteína ligante de cAMP con el sistema proteína quinasa.

En los experimentos encaminados a establecer la relación de la proteína ligante de cAMP con el sistema proteína quinasa se utilizan preparados enzimáticos obtenidos de Sephadex G-200 carentes de la actividad fosfoproteína fosfatasa que eluye conjuntamente con PL en hidroxapatito (FIG 87). El preparado que se denomina A tiene una actividad ligante de cAMP de 2.100 cpm³H/25 µl y el que se denomina B, obtenido por concentración de A, de 5500 cpm³H/25 µl en las condiciones de ensayo empleadas.

En las FIG 83, 84 y 85 se representa la variación de la actividad quinásica PQI-1, PQI-2 y del preparado de membranas (obtenido según el ESQUEMA 4), respectivamente, por la presencia en el ensayo de cantidades crecientes de proteína ligante de cAMP (prep. A). El volumen añadido en el ensayo de los distintos preparados de proteína quinasa es de 25 µl, con una proporción de ésta a la proteína ligante de 1:1; 1:2 y 1:3 (v/v). La medida de actividad quinásica se realiza en ausencia de nucleótidos cíclicos, con preincubación previa durante 30 min a 0° C de las enzimas cuya interacción se pretende detectar.

La proteína ligante de cAMP (PL) inhibe, dependiendo de su concentración, la PQI-2 (FIG 84) y la actividad quinásica asociada a membranas (FIG 85), mientras que no afecta en absoluto a PQI-1 (FIG 83), al menos en las condiciones de ensayo empleadas.



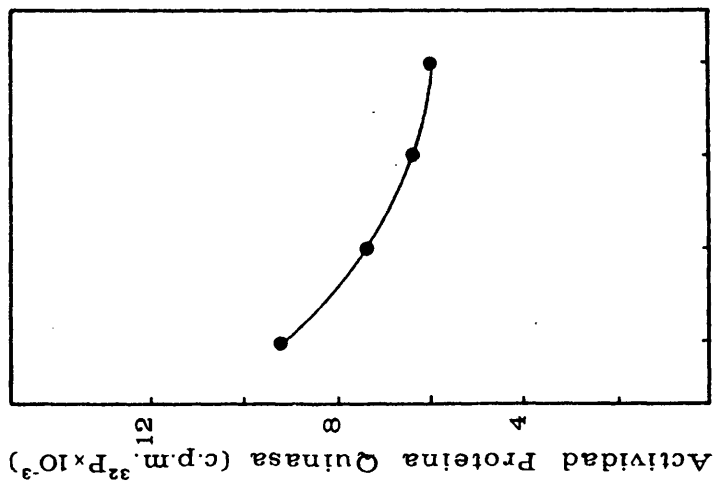


FIG.85.- Efecto de la proteína ligante de cAMP (PL) sobre la actividad de proteína quinasa asociada a membranas.

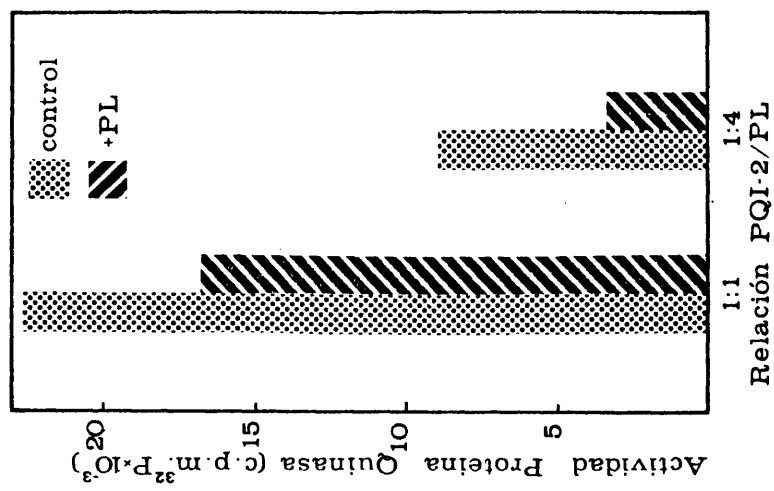


FIG.86.- Efecto de la proteína ligante cAMP (PL) sobre la actividad de la enzima PQL-2.

El hecho de que la inhibición no sea más pronunciada puede ser debido a que la proteína ligante no se encuentre en la concentración adecuada.

En la FIG 86 se representa la actividad de PQI-2 cuando esta enzima y el preparado B de PL están en el ensayo en proporción 1:1 y 1:4 (v/v). La inhibición conseguida en este último caso alcanza el 60%.

T A B L A XIII

Influencia de la preincubación y presencia de cAMP sobre la inhibición de la actividad de proteína quinasa (PQI-2) por parte de la proteína ligante de cAMP (PL).

<u>Condiciones del ensayo</u>		<u>Actividad de proteína quinasa (cpm ³²P)</u>		
<u>Preincubación</u>	<u>cAMP</u>	<u>Control</u>	<u>+ PL (1)</u>	<u>INHIBICION (%)</u>
-	-	10746	10175	5.3
+	-	10202	7119	30.2
+	-	8887	6402	28.0
+	+	8861	7753	12.5

(1) Preparado A

En la TABLA XIII se representa la incidencia del tiempo de preincubación y del cAMP, en la interacción, de la proteína ligante, PL, con PQI-2. Cuando no se lleva a cabo la preincubación/ no se aprecia la inhibición al menos cuando, como en este caso, -

se emplea un preparado diluido de la proteína ligante de cAMP. - En presencia de cAMP se dificulta la interacción entre PQI-2 y - PL disminuyendo considerablemente la inhibición de la actividad/ enzimática de la primera por efecto de la segunda.

En vista de los resultados obtenidos, se pueden formular una serie de hipótesis. La proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos, PQI-2, podría coincidir con la subunidad ca talítica del sistema PQA en tanto que PL podría tratarse de la/ subunidad reguladora, cuya reasociación explicaría la inhibición puesta de manifiesto en las FIG 84 y 86. En este mismo sentido,/ experimentos de inhibición de la unión de ^3H -cAMP a la proteína- ligante por diferentes nucleótidos cíclicos han puesto de mani- fiesto la alta especificidad de la enzima por cAMP. Teniendo en/ cuenta los tamaños moleculares de las proteínas ligantes de cAMP de larva y cabeza de insecto adulto (FIG 82B), la primera podría/ tratarse de un monómero R y la segunda de un dímero R_2 .

La inhibición de la actividad de proteína quinasa aso- ciada a membranas por la proteína ligante de cAMP (FIG 85) permi te relacionarla con las proteína quinasas dependientes de cAMP - de fracción soluble.

3.8. Aislamiento y caracterización de un inhibidor termoestable del sistema proteína quinasa

3.8.1. Purificación.

Las etapas del proceso se encuentran resumidas en el - ESQUEMA 8.

En la FIG 87 se representa la actividad inhibidora de - proteína quinasa y las actividades de fosfoproteína fosfatasa y - ligante de cAMP en el eluido resultante de cromatografiar en Biogel HTP el sobrenadante de ultracentrifugación, SUC, obtenido de - cabezas de insecto adulto. El máximo de actividad inhibidora coincide con el de las proteínas no retenidas. La asimetría del pico/ se puede explicar por la inhibición ejercida por la proteína li-- gante de cAMP sobre la proteína quinasa y por la defosforilación/ catalizada por la fosfoproteína fosfatasa.

Cuando se calienta en baño a ebullición durante 15-20 - min una alícuota de la fracción correspondiente al máximo de acti- vidad inhibidora y posteriormente se mide su efecto sobre la acti- vidad quinásica resulta que este tratamiento no supone pérdida de la actividad inhibidora. La termoestabilidad del inhibidor es, en principio, una propiedad fundamental al objeto de la purificación del mismo y el tratamiento térmico se utiliza como etapa alterna- tiva previa a la cromatografía en hidroxipatito (ESQUEMA 8). La/ columna de Biogel HTP en la que se cromatografía el preparado SCQ es de dimensiones mucho más reducidas debido a la desproteneiza- ción parcial previa del mismo. En hidroxipatito quedan retenidos una considerable cantidad de pigmentos muy abundantes en el mate- rial biológico de partida. Las fracciones con actividad inhibido- ra del eluido de hidroxipatito, o la fracción no retenida en el/ mismo, se liofilizan (éste es el único método posible de concentra- ción teniendo en cuenta el bajo peso molecular del inhibidor ver/ apartado 3.8.4).

En las FIG 88 y 89 se representan los perfiles de acti- vidad inhibidora resultantes de cromatografiar los preparados con

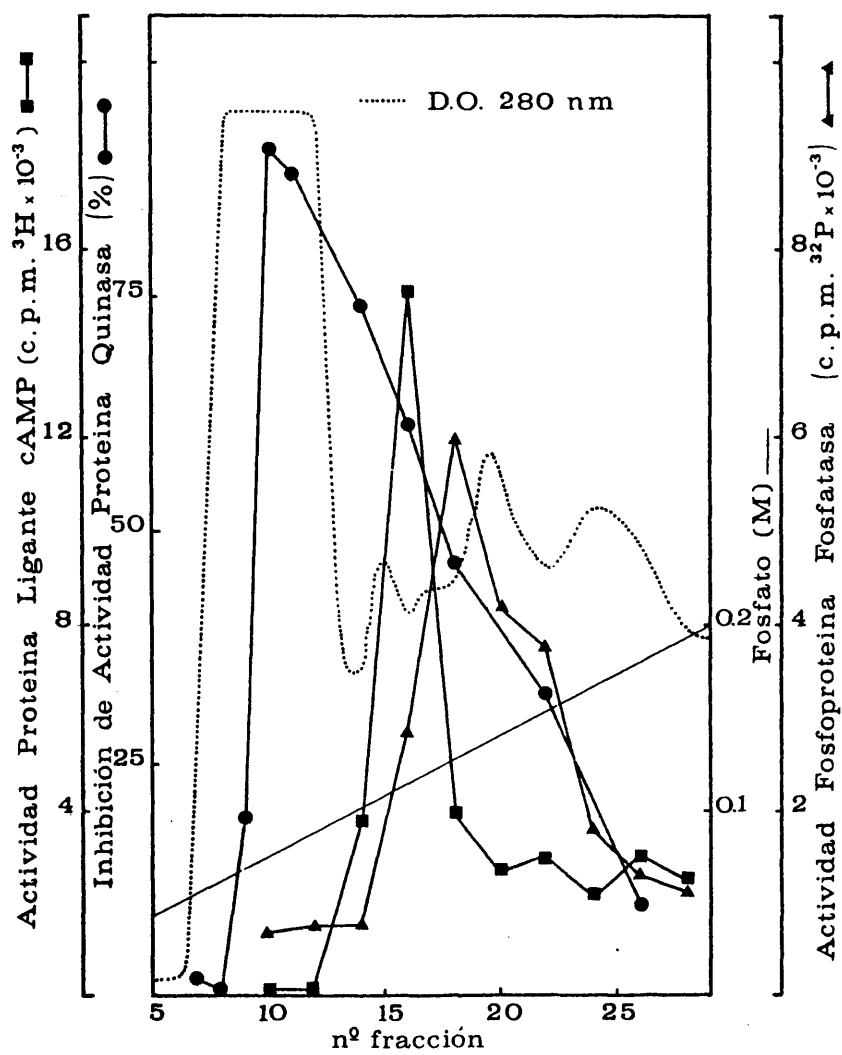


FIG.87.- Perfil del eluido de la cromatografía en hidroxiapatito del sobrenadante de centrifugación obtenido a partir de cabezas de insecto adulto.

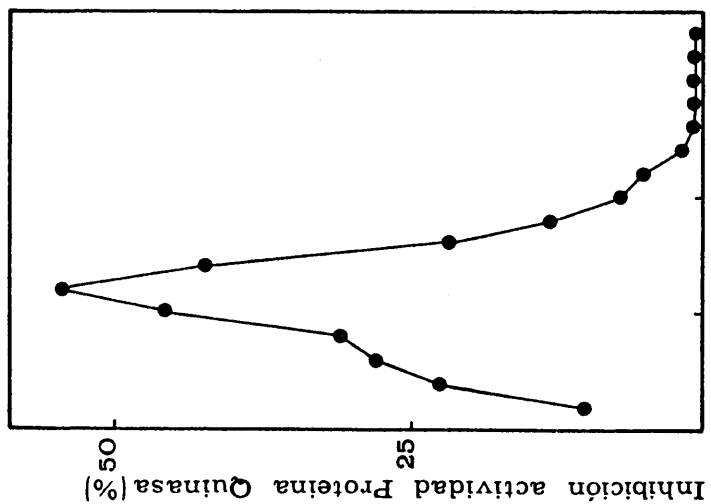


FIG. 88.- Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-25(6x26.5 cm) del inhibidor I.

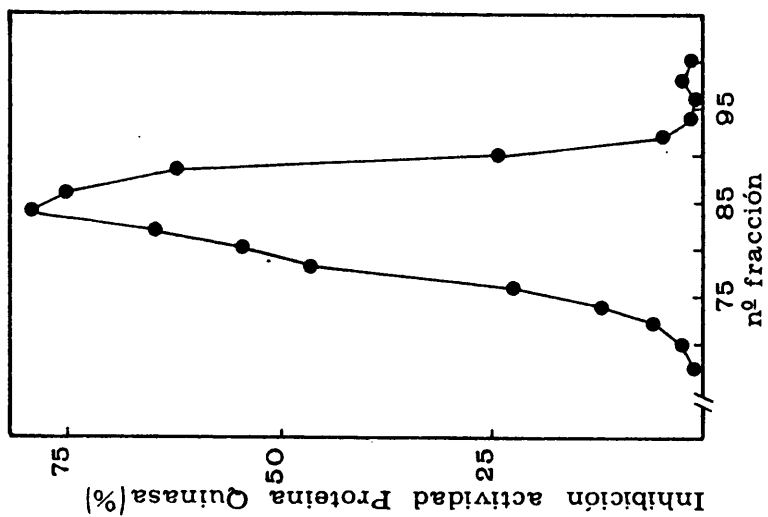


FIG. 89.- Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-25 (1.7x90 cm) del inhibidor I.

centrados del inhibidor procedentes de Biogel HTP en Sephadex G-25 (columnas de 6 x 26.5 cm y de 1.7 x 90 cm, respectivamente). El volumen de elución de la actividad inhibidora en Sephadex G-25 es superior al volumen total de la columna, lo que indica su retención por este tipo de geles. Un comportamiento similar se observa cuando se cromatografía en Sephadex G-50.

Los preparados con actividad inhibidora procedentes de Sephadex G-25 se cromatografían en Dowex 50 W x 4 y se liofiliza la fracción eluida con HCl 0.4 N en la que se encuentra la actividad inhibidora. La determinación de las condiciones de elución en Dowex 50 W x 4 se lleva a cabo eluyendo sucesivamente la columna con 5 ml de agua destilada y el mismo volumen de HCl 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1.0 N. Se liofilizan las fracciones obtenidas, se redisuelve en agua destilada (1 ml) y se mide la actividad inhibidora de proteína quinasa resultando que ésta reside exclusivamente en la fracción 0.4 N de HCl. No es aconsejable la neutralización de los eluidos del Dowex 50 W x 4 por la dificultad que entraña la eliminación de las sales formadas. En estos niveles de purificación se puede detectar el inhibidor espectrofotométricamente una vez conocido su espectro de U.V. (apartado/ 3.8.2). Generalmente, se mide primero la absorbancia a 260 nm y/ si es preciso, se realiza el espectro de U.V. completo de una fracción determinada y después se comprueba la actividad inhibidora mediante ensayo de proteína quinasa.

En la FIG 90 se representa la absorbancia a 260 nm del eluido resultante de cromatografiar en Sephadex G-10 el preparado concentrado correspondiente a la fracción de HCl 0.4 N de Dowex 50 W x 4 (sin tratamiento térmico previo). En dicha figura

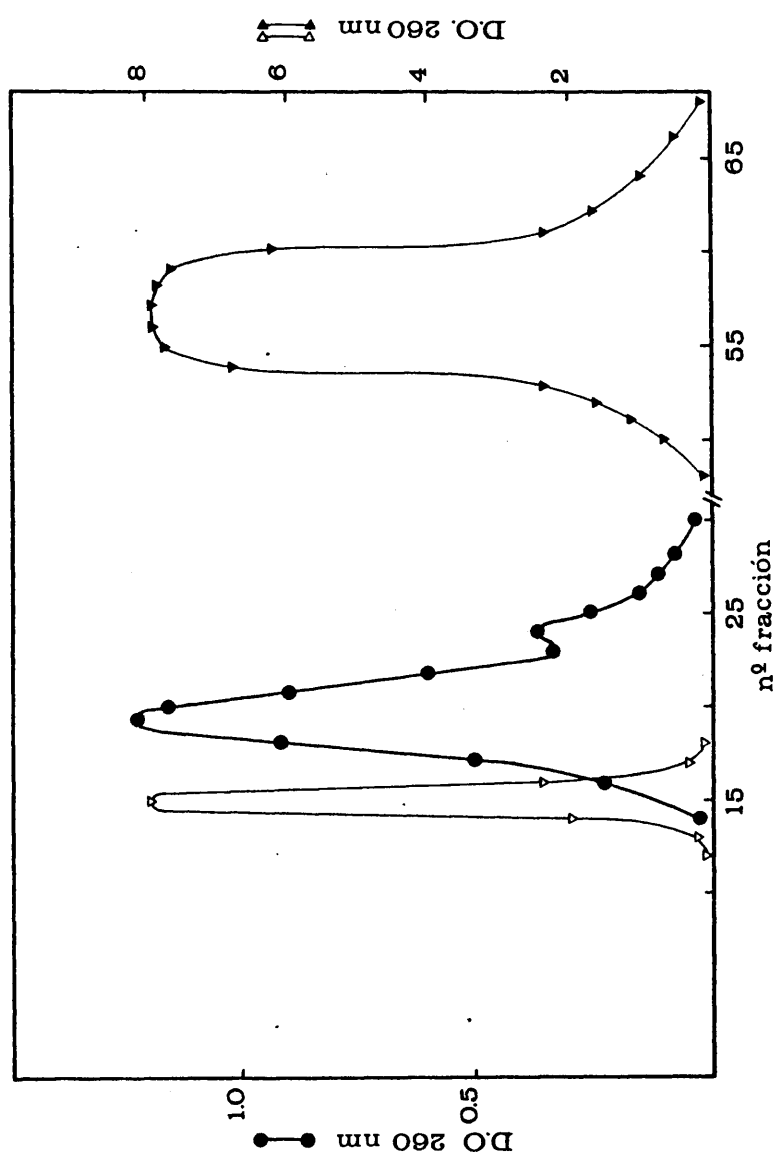


FIG. 90. Perfiles de los eluidos de la cromatografía en Sephadex G-10 del inhibidor I, AMP y adenosina.

se representan también los perfiles de elución en condiciones -- cromatográficas idénticas de adenosina y AMP, resultanto el del/ inhibidor semejante al de este último, hecho éste, que al lado - del espectro U.V., permite hipotetizar acerca de la naturaleza - del inhibidor y establecer así la experimentación subsiguiente.

En las FIG 91A y 91B se comparan los perfiles de elu-- ción en Sephadex G-10 del inhibidor purificado sin calentamiento (I) y con tratamiento térmico (I'), respectivamente. En ambos ca sos se detectan dos formas del inhibidor (Ia e Ib; I'a e I'b). - El hecho de que la forma b que eluye a mayor volumen, sea mayorita ria en el preparado obtenido con tratamiento térmico, podría indi car que se trata de un producto de degradación originado a par-- tir de la forma a por las particulares condiciones en que se ha/ llevado a cabo el proceso de purificación (calefacción y cromato grafías a temperatura ambiente). No obstante, la actividad inhi bidora es directamente proporcional a la absorbancia de las for mas a y b tanto en el preparado I como en el I'.

En la FIG 92 se muestran los componentes de los prepa rados Ia e I'a (procedentes del Sephadex G-10), separados median te electroforesis en capa fina y visualizados mediante luz ultra violeta a 254 nm. La banda más intensa tanto para Ia como para - Ia' es la que se encuentra más próxima al AMP, sin que coincida exactamente, aunque esto puede ser debido a la diferencia de ma sa aplicada en uno y otro caso. Las restantes bandas podrían tra tarse de productos de degradación (una de ellas tiene una posi-- ción similar a la de la adenosina).

El revelado de la placa con ninhidrina indica las exis

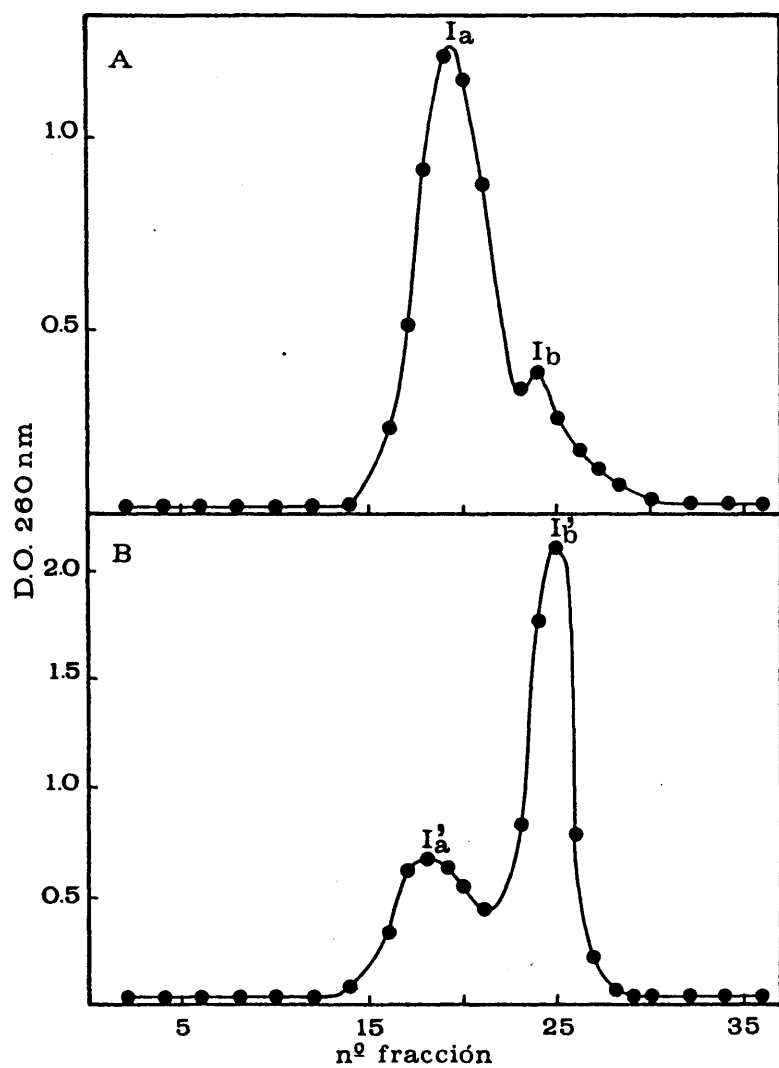


FIG. 91.- Comparación de los perfiles de los eluidos de las cromatografías en Sephadex G-10 del inhibidor I sin tratamiento térmico previo (A) y con tratamiento térmico previo (B).

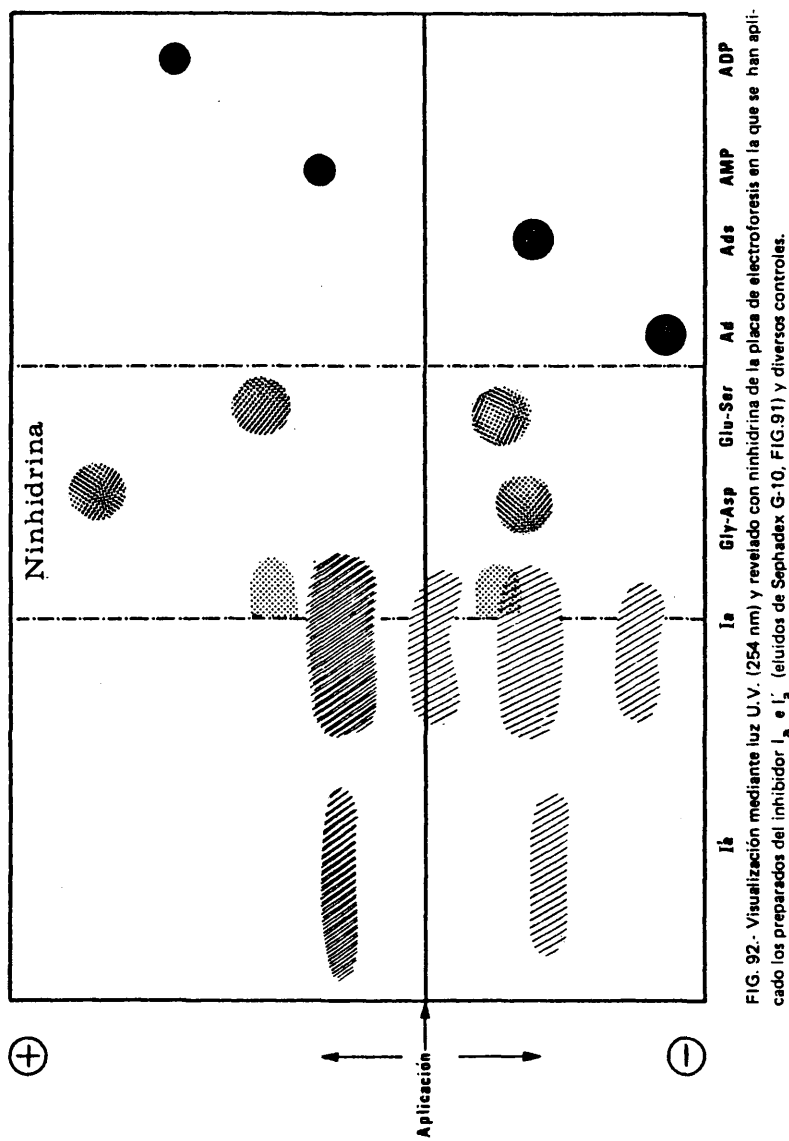


FIG. 92. Visualización mediante luz U.V. (254 nm) y revelado con ninhidrina de la placa de electroforesis en la que se han aplicado los preparados del inhibidor I_a e I_b (eluidos de Sephadex G-10, FIG. 91) y diversos controles.

tencia en el preparado Ia de aminoácidos, concretamente de glutámico y aminoácidos neutros, como glicocola o serina, que no están relacionados con los productos visualizados con luz ultravioleta. El ensayo de actividad inhibidora de los eluidos con agua/destilada de las zonas no reveladas con ninhidrina de estos últimos, indica que la actividad inhibidora se encuentra en la banda mayoritaria.

En el proceso de purificación sin tratamiento térmico, partiendo de 11 g de cabezas de insecto adulto se obtienen aproximadamente 60 µg del inhibidor.

2.3.2. Determinación de la naturaleza y características físicas del inhibidor.

En la FIG 93 se muestra el espectro U.V. (efectuado - la corrección por turbidez) de la banda mayoritaria obtenida en la electroforesis en capa fina del preparado Ia y se compara con el del AMP (los espectros se realizan con ambos productos disueltos en agua destilada). Los máximos del espectro del inhibidor y del AMP coinciden (aproximadamente 258 nm) pero el mínimo se - desplaza hacia la derecha y hacia arriba; desplazamiento típico/ de la asociación de bases con proteínas o aminoácidos (cromatina) aunque bastante menos acentuado. El espectro U.V. de los productos resultantes en las distintas etapas de la purificación del - inhibidor con tratamiento térmico previo, no siempre presenta - este desplazamiento y el mínimo se sitúa entonces alrededor de - 229 nm. La molécula inhibidora no absorbe en la región visible.

En el análisis de aminoácidos, con hidrólisis previa - del componente mayoritario de Ia separado electroforéticamente -

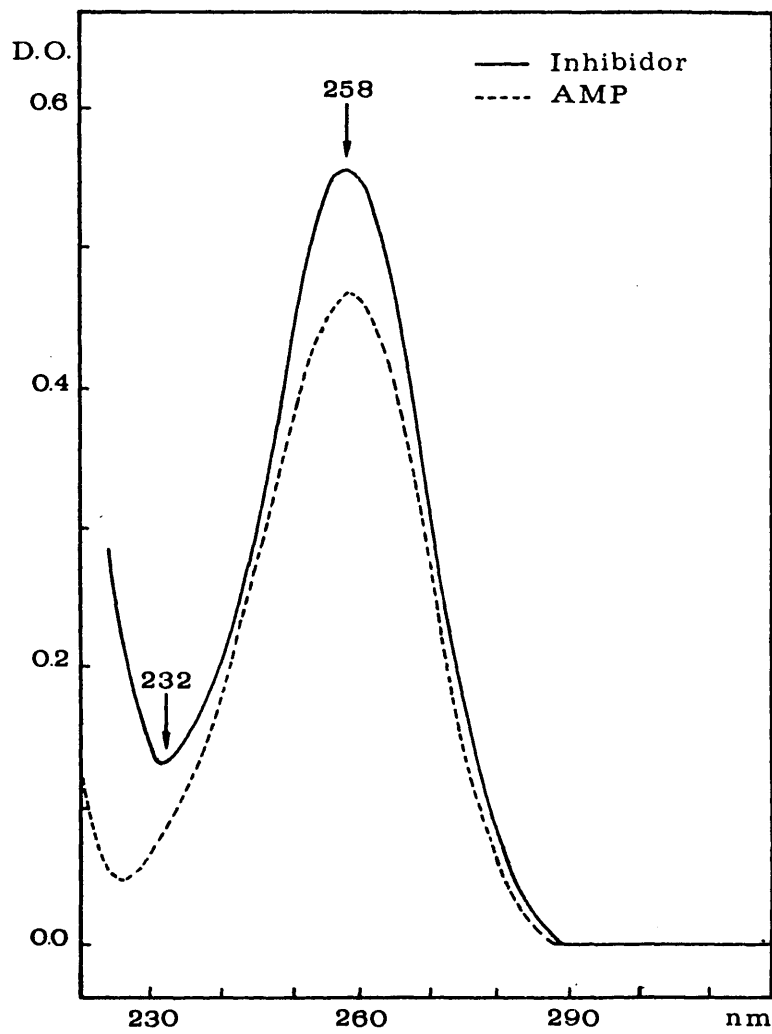


FIG.93.- Espectro de absorción en U.V. del inhibidor I y de AMP.

se detecta la presencia de glutámico (glutamina), aspártico (asparagina), glicocola y serina. Estos mismos aminoácidos se encuentran en los preparados, previamente hidrolizados obtenidos en la elución de Dowex 50W x 4. Cuando se efectúa el análisis sin hidrólisis previa no aparece aminoácido alguno o únicamente/serina si en la purificación se ha omitido el tratamiento térmico, sin embargo, se detecta la presencia de glutámico (glutamina), glicocola y serina si se ha efectuado dicho tratamiento. La proporción en que se encuentran estos aminoácidos es variable aunque la relación generalmente detectada es de aproximadamente/la mitad de aspártico (asparagina) que de glutámico (glutamina), y de 2-4 veces más glicocola que glutámico (glutamina). Esta variación puede ser explicada en términos de la posible inestabilidad de la molécula inhibidora pudiendo encontrarse presentes diferentes derivados de la misma. Otra posible explicación es la coexistencia de distintas especies de moléculas inhibidoras de cuya proporción relativa dependería la de los aminoácidos detectados. La existencia de una cierta heterogeneidad en el inhibidor, no necesariamente debida a la degradación, sería compatible con los perfiles de los eluidos de Sephadex G-10 y con la anchura de la banda mayoritaria de la electroforesis de Ia. El hecho/de que no se detecten aminoácidos en dicha banda al revelar con/ninhidrina se puede explicar en base a un bloqueo del aminoácido N-terminal.

La interpretación de los espectros de RMN del preparado del inhibidor, intercambiado con D_2O , correspondiente a la fracción eluida del Dowex 50W x 4 con HCl 0.4N (con tratamiento/térmico previo), muestra la presencia de glutámico, aspártico, glicocola y serina, de una base púrica (posiblemente adenina) y/

de un azúcar que pudiera tratarse de una forma desoxi de la ribosa. La proporción de la base respecto al conjunto de aminoácidos es de un 15-20% (según la intensidad de las señales del espectro). El hecho de que los aminoácidos presentes se encuentren en su mayoría libres, se puede explicar por la presumible inestabilidad de la molécula inhibidora, sugerida anteriormente, teniendo en cuenta que el preparado se mantiene durante un tiempo prolongado a temperatura ambiente.

Por otra parte, se comparan los espectros I.R. de la fracción eluida de Dowex 50W x 4 con HCl 0.4 N (tratamiento térmico previo) y del componente mayoritario del preparado Ia, separado electroforéticamente, con los espectros I.R. de adenina, adenosina, AMP y ATP con el fin de determinar, entre otras características, la presencia de fósforo en la molécula inhibidora. La complejidad de los espectros obtenidos no permite añadir más información acerca de la estructura del inhibidor a la que ya se dispone por la utilización de las técnicas anteriormente mencionadas.

3.3.3. Tratamiento proteolítico.

La actividad inhibidora no se afecta por el tratamiento proteolítico llevado a cabo en condiciones enérgicas con tripsina y pronasa. Estos resultados indican que el inhibidor no es de naturaleza proteica como el originalmente descrito por Walsh y col (150), aunque no se descarta su naturaleza peptídica puesto que algunos péptidos pequeños por su especial composición y conformación podrían resistir este tratamiento y además, suponiendo que el péptido forme parte del inhibidor, es posible que desapare

cida la estructura peptídica el nivel de inhibición se siga manteniendo por la porción de la molécula que contiene el anillo de purina.

2.3.4. Peso molecular.

Teniendo en cuenta la retención de la actividad inhibidora en Sephadex, se llevan a cabo determinaciones aproximadas del peso molecular utilizando membranas de distinto poro. Cuando se dializan preparados del inhibidor frente a pequeños volúmenes de agua destilada utilizando membranas Visking Tubing 18/32, transcurrido cierto tiempo, la actividad inhibidora dentro y fuera de la bolsa de diálisis es idéntica, por lo que en principio se puede asignar al inhibidor un peso molecular inferior a 6000D. Cuando se utiliza un sistema de concentración por ultrafiltración Amicón con una membrana UM-2 impermeable a sustancias de peso molecular superior a 1000 D, se obtienen los resultados que se muestran en la TABLA XIV.

Los datos corresponden a dos experimentos realizados en idénticas condiciones con dos preparados A y B (50 µl/ensayo) de distinta potencia inhibidora. Sólo una parte de la actividad inhibidora atraviesa la membrana ("dializado") y aumenta significativamente la actividad retenida por la misma ("concentrado")./ Estos resultados indican que el peso molecular del inhibidor es del orden del peso molecular medio que discrimina la membrana por lo que la posibilidad de paso del inhibidor a través de la misma se encontraría parcialmente restringida. Otra posible interpretación sería que junto a el/los inhibidor(es) no dializable(s) de peso(s) molecular(es) comprendido(s) entre 1000 y 6000

D existan otro(s) de peso(s) molecular(es) inferior(es) a 1000 D de actividad(es) minoritaria(s). Se ha descrito (350) la existencia en riñón de pollo (fracción soluble) de inhibidores no protóxicos de actividad de proteína quinasa algunas de cuyas características coinciden con las del inhibidor obtenido del insecto.

Independientemente de las consideraciones que puedan hacerse acerca del tamaño del inhibidor, estos resultados obligan a utilizar la liofilización como método de concentración y las cromatografías de penetrabilidad para el desalado de los preparados del inhibidor.

T A B L A X I V

Actividad inhibidora de los preparados obtenidos mediante la utilización de un sistema de concentración por ultrafiltración Amicon (membrana UM-2)

<u>Preparado del inhibidor</u>	<u>Volumen (ml)</u>	<u>Actividad de proteína quinasa</u>	<u>Inhibición (%)</u>
Inicial A	6.0	50182	60.1
Dializado A	2.5	93881	25.3
Concentrado A	3.5	43892	65.1
(Control)	-	125675	-
Inicial B	13.7	11954	93.4
Dializado B	8.7	54743	68.6
Concentrado B	5.0	5015	97.1
(Control)	-	174303	-

3.3.5. Otras características cromatográficas del inhibidor. Retención por adsorbentes.

Cuando se cromatografía en placas de celulosa con el sistema butanol-acetona-acético - NH_3 (5%) - H_2O (7:5:3:3:2; v/v) el preparado del inhibidor purificado hasta la etapa de Sephadex G-25 con tratamiento térmico previo (ESQUEMA 8), se separan seis componentes distintos que se visualizan con luz ultravioleta a 254 nm, de los cuales únicamente el de R_f 0.34 presenta actividad inhibidora. El valor de los R_f obtenidos para los controles/ aplicados son los siguientes:

	<u>ATP</u>	<u>ADP</u>	<u>AMP</u>	<u>cAMP</u>	<u>Hipoxantina</u>	<u>Adenosina</u>
$R_f \times 100$	7	14	32	46	64	64

Como en los casos anteriores, el comportamiento cromatográfico del inhibidor es muy similar al de AMP.

La actividad inhibidora se retiene en DEAE-celulosa y/ eluye con tampón fosfato potásico 100 mM (el máximo coincide con las dos últimas fracciones recogidas) y no se retiene en fosfolulosa, localizándose el máximo en las dos primeras fracciones del lavado de la columna con agua destilada.

El inhibidor se adsorbe por alúmina eluyéndose de la misma con tampón fosfato potásico 100 mM (máximo de actividad en las fracciones 9, 10 y 11). El carbón activo secuestra en su totalidad la actividad inhibidora.

3.3.6. Actividad inhibidora asociada a fracción particulada.

En la TABLA IX se muestra la actividad inhibidora asociada a distintos preparados de fracción particulada (ver apartado 2.3.1). Los mayores porcentajes de inhibición se encuentran en los preparados D y E correspondientes a las interfases 1.00-1.25 y 1.25-1.50 M del gradiente de sacarosa, respectivamente. También hay una considerable actividad inhibidora asociada al SED 2 (ESQUEMA 4).

3.3.7. Mecanismo de inhibición.

El ensayo de actividad inhibidora de proteína quinasa se efectúa en presencia de cAMP, con la enzima extraída mediante choque osmótico del preparado de membranas (STE 1U; ver ESQUEMA 7), añadiendo 6 µg de proteína por ensayo.

En la FIG 94 A se representa el aumento de la inhibición al hacerlo el volumen añadido en el ensayo de un preparado SC2 obtenido a partir del insecto adulto completo como se muestra en el ESQUEMA 3. En la FIG 94 B se muestra el efecto inhibidor de adenina, adenosina, 2'-desoxiadenosina, AMP y ADP a una concentración en el ensayo de 1mM. El ADP es el que presenta mayor inhibición, seguido de adenosina. Otras bases y nucleosidos como guanina, guanosina, xantina, hipoxantina, inosina, citosina, 5-metil-citosina, citidina, timina y uracilo no inhiben la enzima a concentración 1 mM en el ensayo lo que evidencia la necesidad del anillo de adenina para que tenga lugar la inhibición por este tipo de compuestos. De la comparación de las FIG 94A y B se puede concluir que si la inhibición por el preparado SC2 fuera

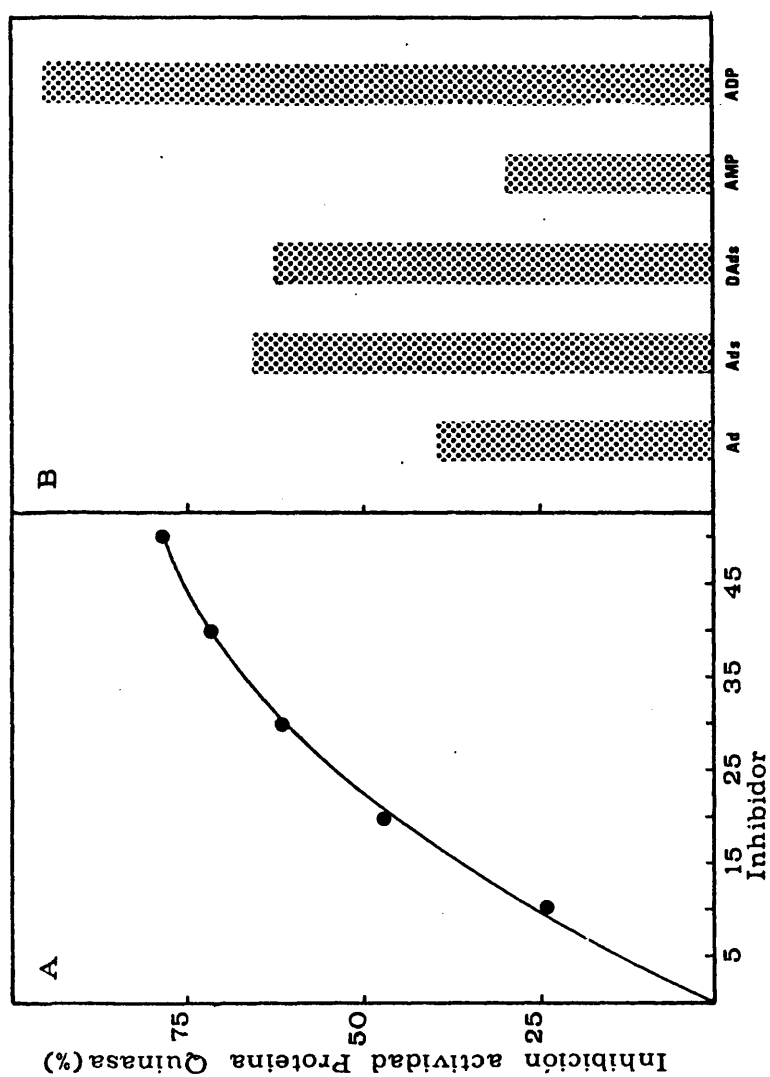


FIG.94.- (A) Efecto del preparado SCQ del inhibidor (ESQUEMA 8), obtenido a partir de insecto adulto sobre la actividad de la enzima PQM-2. (B) Efecto de adenina(Ad), adenosina (Ads), 2'- desoxiadenosina(DAds), AMP y ADP sobre la actividad de la enzima PQM-2 (concentración 1 mM en el ensayo).

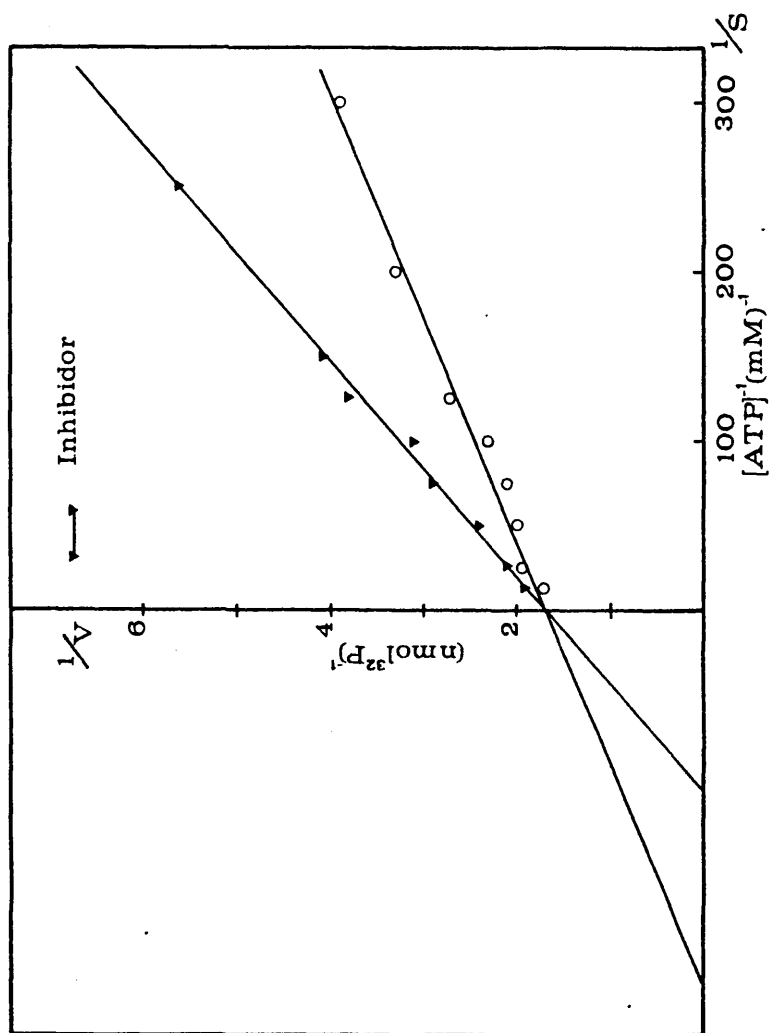


FIG.95.- Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de la enzima PQM-2 frente a ATP en ausencia y en presencia del inhibidor I.

exclusivamente debida a la presencia en el mismo de distintos nucleosidos y nucleotidos de adenina estos deberían encontrarse/ en el material biológico en concentraciones del orden de 10 mM, teniendo en cuenta la dilución del inhibidor experimentada en la homogeneización y en el ensayo de actividad y suponiendo una relación lineal de concentración-actividad inhibidora.

En la FIG 95 se muestra el efecto del inhibidor (preparado I'b; FIG 91B) sobre la afinidad de la enzima PQM-2 (STE 1U, ESQUEMA 6) para el ATP. El inhibidor, al menos el del preparado utilizado, actúa competitivamente con el ATP, con un mecanismo similar al de los compuestos de adenina (119), aumentando la K_m de la enzima para el ATP sin alterar la $V_{m\acute{a}x}$.

3.3.8. Efecto del inhibidor sobre los distintos componentes del sistema proteína quinasa.

En la TABLA XV se muestra el efecto del inhibidor endógeno sobre la actividad de las distintas proteína quinasas y sobre la proteína ligante de cAMP (método B en tampón acetato). Se utilizan preparados parcialmente purificados del inhibidor resultantes de las cromatografías en Biogel HTP y Sephadex G-25, con tratamiento térmico previo (ESQUEMA 3), las enzimas PQA-1 y PQA-2 obtenidas de Biogel HTP (ESQUEMA 1); PQG de Ultrogel AcA 44 (ESQUEMA 2), PQI-1 y PQI-2 de fosfocelulosa (ESQUEMA 3), proteína ligante de cAMP, PL, de Biogel HTP (ESQUEMA 7) y los preparados de membranas (ESQUEMA 4).

Todas las proteína quinasas, tanto de fracción soluble como particulada y la proteína ligante de cAMP se inhiben acentuadamente.

TABLA XV

EFECTO DEL INHIBIDOR ENDOGENO SOBRE LOS DISTINTOS COMPONENTES DEL SISTEMA PROTEINA QUINASA

ENZIMA	ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA (c.p.m. 32p)					
	SIN INHIBIDOR			CON INHIBIDOR		
	CONTROL	cAMP	cGMP	CONTROL	cAMP	cGMP
PQA-1	38331	74453	63871	11674	18055	15009
				69,5	75,7	76,5
PQA-2	1126	51296	26301	370	18148	6296
				67,1	64,6	76,1
PQG	8625	10038	33625	5626	7252	20623
				34,8	27,8	38,7
PQI-1	11103	10686	11167	2708	2511	2583
				75,6	76,5	76,9
PQI-2	36756	37297	36486	5135	5169	5405
				86,0	86,1	85,2
Prep. MEMBRANAS	8106	13975	10122	5287	8523	6850
				34,8	27,8	38,7
ACTIVIDAD PROTEINA LIGANTE DE cAMP (c.p.m. 3 H)						
PL	SIN INHIBIDOR			CON INHIBIDOR		
	1894			971		42,3

damente por el inhibidor endógeno. La variación en los porcentajes de inhibición, puede ser debida a la distinta concentración/ de los preparados enzimáticos utilizados y del propio inhibidor.

El hecho de que la inhibición de las proteína quinasas sea similar en presencia y en ausencia de nucleótidos cíclicos - es compatible con los resultados que sugieren que el efecto inhibidor se produce a través del centro activo para el ATP (apartado 3.3.7), aunque la inhibición de la proteína ligante de cAMP - indica que, al menos en las proteína quinasas dependientes de - cAMP, un mecanismo alternativo sería la inhibición de la unión - del cAMP al sitio receptor correspondiente en la subunidad reguladora.

3.3.9. Efecto del inhibidor sobre otros sistemas enzimáticos.

El inhibidor también actúa sobre las actividades de - fosfoproteína fosfatasa y de adenilato ciclasa. El preparado del inhibidor utilizado es el que resulta de cromatografiar en Sephadex G-25, con tratamiento térmico previo (ESQUEMA 3). La fosfoproteína fosfatasa se obtiene a partir de insecto adulto mediante la utilización de DEAE-celulosa y Sepharosa-histona. La actividad adenilato ciclasa de los preparados de membranas se mide - en nuestro laboratorio (351) utilizando el método de Salomon y - col (352). Se ha descrito una potente actividad inhibidora de - adenilato ciclasa en eritrocitos de rana y varios tejidos de - rata que análisis físicos, químicos y enzimáticos subsiguientes - han demostrado que se trata de 2'-desoxiadenosina -3'-monofosfato (2'-desoxi- 3'-AMP) (353 y 354). La presencia de este inhibidor sugiere la posibilidad de que los desoxinucleótidos pueden -

jugar un importante papel en la acción hormonal y en la regulación del metabolismo celular.

La inhibición de fosfoproteína fosfatasa y adenilato - ciclasa por el inhibidor obtenido del insecto, junto con los datos disponibles acerca de su incidencia sobre el sistema proteína quinasa (apartado 3.8.8), sugieren que puede estar implicado en la compleja regulación del sistema nucleótidos cíclicos-fosforilación-defosforilación de proteínas a través del cual ejercen su función multitud de efectores fisiológicos (FIG 1).

3.9.10. Variación de la actividad inhibidora a lo largo del desarrollo.

En la TABLA XVI se muestra la inhibición de la actividad quinásica y ligante de cAMP por los preparados SCQ, obtenidos a partir de distintos estadios del desarrollo del insecto como se indica en el ESQUEMA 3, salvo que la homogeneización se efectúa con tampón B en una proporción 1:2 (p/v). En la TABLA XVI se encuentra también la concentración de proteínas de cada preparado por 25 μ l que es el volumen añadido en el ensayo de actividad inhibidora. Se utilizan dos enzimas distintas, la proteína quinasa dependiente de cAMP de corazón bovino, tipo II, de la que se adicionan 5 y 15 μ g en los ensayos de actividad quinásica y ligante de cAMP extraída mediante choque osmótico de la membrana (STE IV, ESQUEMA 6), de la que se adicionan 6 μ g en el ensayo de actividad quinásica. En ambos casos, como es habitual, el ensayo de actividad de proteína quinasa se efectúa en presencia de cAMP y en ensayo de actividad ligante de cAMP por el método B en tampón acetato (apartado 2.2.2).

TABLA XVI

Variación de la actividad inhibidora de proteína quinasa y proteína ligante de cAMP durante el desarrollo del díptero *Ceratitis capitata*

MUESTRA DE INHIBIDOR	Conc. Proteínas ($\mu\text{g}/25\mu\text{l}$)	Actividad de proteína quinasa				Actividad proteína ligante de cAMP			
		32P (a)	o/e Inhib.	c.p.m.	32P (b)	o/e Inhib.	3H (e)	o/e Inhib.	o/e Inhib.
HUEVO	63	52672	53.5	6987	6987	93.9	6987	32.3	
LARVA DE 3 DIAS	165	109535	13.7	19750	5821	82.7	5821	43.6	
LARVA DE 5 DIAS	115	101721	19.9	31761	8583	72.1	8583	16.8	
LARVA DE 7 DIAS	144	58737	53.7	18875	8391	83.4	8391	18.6	
APOLISIS	213	129740	0.0	39815	9316	65.1	9316	9.7	
ADULTO FARATO DE 2 DIAS	269	126303	0.0	28697	8275	74.8	8275	19.8	
ADULTO FARATO DE 4 DIAS	378	104787	17.5	22696	8371	80.1	8371	18.9	
ADULTO FARATO DE 6 DIAS	350	87427	31.5	14958	8698	86.9	8698	15.7	
ADULTO FARATO DE 8 DIAS	450	88684	30.1	15590	9306	86.3	9306	9.8	
ADULTO DE 1 DIA	195	95392	29.4	25406	7938	77.7	7938	2.3	
CONTROL	—	126964	0.0	113926	10316	0.0	10316	0.0	

(a) Proteína quinasa dependiente de cAMP de corazón bovino (Tipo II).

(b) Proteína quinasa asociada a membranas (STE 1U) de *Ceratitis capitata*.

Se aprecian tres máximos de inhibición de la actividad proteína quinásica, en huevo, en larva de 6 días y al final del estado de adulto farato (6 y 8 días). Si bien los perfiles de inhibición para ambas proteína quinasas son similares, su magnitud es distinta, resultando mucho más pronunciada para la enzima extraída de membrana. Teniendo en cuenta que la concentración de las dos enzimas en el ensayo y su actividad específica es muy similar, esta inhibición preferente de la proteína quinasa del insecto podría indicar una cierta especificidad por parte del inhibidor.

La inhibición de la actividad ligante de cAMP a lo largo del desarrollo varía en cierto modo de forma opuesta a la de la actividad quinásica y así, el máximo de inhibición de actividad ligante de cAMP en larva de 3 días se corresponde con uno de los mínimos de inhibición de actividad quinásica y el mínimo de inhibición de actividad ligante de cAMP en adulto farato de 8 días se corresponde con un máximo de inhibición de actividad quinásica. En la apolisis coinciden la menor inhibición de actividad quinásica y de actividad ligante de cAMP. Es muy probable que la variación a lo largo del desarrollo de la actividad inhibidora sea el resultado de la contribución de distintos inhibidores.

283

L

CONCLUSIONES

El objetivo de la presente investigación lo ha constituido el estudio del sistema enzimático proteína quinasa del díptero Ceratitis capitata, tanto en fracción soluble como en fracción particulada, para lo cual se ha utilizado el insecto en todas las etapas del desarrollo así como cabeza de adulto. Previamente, ha sido necesario poner a punto los métodos radioenzimáticos para la medida de las actividades fosfotransferasa y ligante de nucleótidos cíclicos. De la experimentación realizada, cuyos resultados se han expuesto anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

4.1. Existen en fracción soluble dos actividades de - proteína quinasa dependientes de cAMP (PQA-1 y PQA-2), mayoritarias, una actividad de proteína quinasa dependiente de cGMP - (PQG), dos actividades de proteína quinasa independientes de nucleótidos cíclicos (PQI-1 y PQI-2), una actividad ligante de - cAMP (PL), no asociada a actividad quinásica, y una actividad inhibidora de todas las actividades enzimáticas mencionadas que incide, además, sobre adenilato ciclasa y fosfoproteína fosfatasa.

4.2. La recuperación en fracción soluble de la actividad quinásica translocada artefactualmente a la fracción particulada se consigue mediante el aumento de la fuerza iónica en el - tampón de homogeneización.

4.3. Existen dos proteína quinasas dependientes de -- cAMP asociadas a membranas, PQM-1 y PQM-2, la segunda de las cuales se extrae de las mismas mediante choque osmótico mientras - que la primera unicamente se solubiliza con detergentes. Existe, asimismo, una actividad inhibidora de proteína quinasa y adenilato ciclasa asociada a fracción particulada.

4.4. Las proteína quinasas dependientes de cAMP de -- fracción soluble tienen tendencia a constituirse en agregados culya formación viene favorecida por la concentración del preparado enzimático y el trascurso del tiempo. La agregación, que no re-- vierte con la fuerza iónica, parece tener distinta importancia - dependiendo de la etapa del desarrollo del insecto utilizada para la obtención de la enzima.

4.5. La enzima PQA-2 es una proteína quinasa dependiente de cAMP de tipo I. PQA-1, sin embargo, no ha podido ser clasificada de forma inequívoca.

4.6. El peso molecular determinado por cromatografía - de penetrabilidad para la holoenzima de PQA-2 es de 80.000 D, - de 160.000 D para la forma agregada y de 39.000 D para la subunidad catalítica. La enzima se encuentra en la forma de menor peso molecular, presumiblemente de estructura RC, y el paso a la forma agregada (R_2C_2) se produce en determinadas condiciones experimen-

mentales. Debido a la presencia simultánea de las dos formas de la holoenzima como consecuencia de la existencia del equilibrio/ de agregación, se obtienen unas cinéticas complejas que dificultan la determinación de algunos parámetros enzimáticos.

4.7. Las enzimas PQA-1 y PQA-2, como las restantes proteína. quinasas estudiadas, tienen un absoluto requerimiento de - cación divalente para su actividad. Mg^{2+} y en menor proporción - Co^{2+} , satisfacen estos requerimientos. Otros cationes divalentes/ como Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} son inhibidores. La concentración - óptima de Mg^{2+} para PQA-2 se sitúa alrededor de 10 mM y ambas en zimas se inhiben a elevadas concentraciones del catión y en general cuando aumenta la fuerza iónica en el ensayo que aparentemen te tiene además un efecto disociante sobre PQA-2 sin afectar a - PQA-1 en este aspecto. PQA-2 se disocia también al aumentar el - tiempo de incubación y la concentración de histona en el ensayo.

4.8. La preferencia por diversos sustratos de PQA-1 y/ PQA-2 es muy similar con valores de K_m ap de PQA-2 para la histo na (fracción total) de 0.25 mg/ml.

4.9. El efecto activador sobre PQA-2 de diversos nucleo tidos cíclicos ensayados decrece según la siguiente secuencia: - cAMP > cIMP > cGMP > cUMP \simeq cCMP > cTMP.

4.10. Se observa una significativa fosforilación endó- gena de los preparados de membranas. La preferencia en la fosfo rilación de diversos sustratos y la concentración óptima de Mg^{2+} para la enzima solubilizada son similares a la de las proteína - quinasas dependientes de cAMP de fracción soluble.

4.11. A la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP solubilizada de membranas le corresponde un elevado peso molecular (superior a 300.000 D), posiblemente debido a la formación de agregados como consecuencia de la extracción de la enzima de su entorno lipídico o debido a su asociación con alguna proteína intrínseca de membrana.

4.12. La solubilización de la enzima que permanece asociada a las membranas después del choque osmótico, PQM-1, aumenta su actividad lo que indica una asociación intrínseca con la estructura de membranas. La elevada actividad de PQM-2, extraída mediante choque osmótico, puede ser debida a que la enzima queda fuera del control del inhibidor asociado a membranas. La presencia de este inhibidor no permite evaluar la proporción relativa de ambas enzimas.

4.13. La caracterización enzimática diferencial de PQM-1 y PQM-2 indica que la segunda presenta una afinidad por los sustratos muy similar a PQA-2, con valores de K_m para el ATP de 4 μ M y para la histona de 0.25 mg/ml; muy diferentes a los de PQM-1 (10 μ M y 1.5 mg/ml, para ATP e histona, respectivamente). PQM-1 y PQM-2 difieren también en su activación por cAMP. Se puede concluir que las dos actividades enzimáticas asociadas a membranas son distintas pudiendo tratarse PQM-2 de la enzima de fracción soluble PQA-2 translocada.

4.14. La proteína quinasa dependiente de cGMP de fracción soluble, PQG, tiene un tamaño similar o algo menor al de PQA-2 (70.000 -30.000 D) y una estructura presumiblemente monomérica que confiere a la enzima una gran singularidad en cuan-

to al mecanismo de activación se refiere.

4.15. El catión divalente que mejor satisface los requerimientos de PQG es el Mg^{2+} seguido del Co^{2+} y en mucha menor proporción del Mn^{2+} . Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} resultan inhibidores. La concentración óptima de Mg^{2+} para la actividad y activación por cGMP de la enzima es muy elevada (100 mM) cuando se utiliza/histonas como sustrato mientras que cuando se utiliza protamina/la concentración óptima de Mg^{2+} es similar a la de las proteínas/quinasas dependientes de cAMP (10 mM). El aumento de la concentración de Mg^{2+} disminuye la K_m de la enzima para el ATP sin alterar la $V_{máx}$. Se puede concluir que el Mg^{2+} actúa modificando la afinidad de la enzima hacia determinados sustratos proteicos/ y el ATP. La concentración óptima de Co^{2+} se sitúa alrededor de/1mM, utilizando histona como sustrato.

4.16. El valor de K_m ap para el ATP de PQG es de aproximadamente 9 μM . El cGMP aumenta la $V_{máx}$ sin alterar el valor de K_m para el ATP.

4.17. El efecto activador sobre PQG de diversos nucleótidos ensayados decrece según la siguiente secuencia:



4.18. La PQG no se inhibe por la proteína inhibidora de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

4.19. La PQG no requiere compuestos con grupos tiólicos ni para su actividad ni para su activación por cGMP.

4.20. El tamaño de la proteína quinasa independiente - de nucleótidos cíclicos de fracción soluble, PQI-1, es similar - al de PQG y PQA-2 (70.000 - 80.000 D), mientras que el de PQI-2 - es considerablemente menor.

4.21. La concentración óptima de Mg^{2+} para PQI-1 y -- PQI-2 oscila alrededor de 10 mM y la preferencia por diversas - fracciones de histonas es muy similar para ambas excepto para la H3, más eficazmente fosforilada por PQI-1.

4.22. La proteína ligante de cAMP, PL, que carece de - actividad quinásica, tiene una elevada especificidad por este nucleotido cíclico.

4.23. El tamaño molecular de PL varía en función de la etapa del desarrollo del insecto utilizada para su obtención. La de cabeza de insecto adulto tiene un peso molecular similar a -- PQA-2, PQG y PQI-2 (70.000 - 80.000 D) mientras que la de larva, en donde se encuentra en menor proporción, tiene un peso molecular considerablemente menor.

4.24. La inhibición por parte de PL de la actividad de PQI-2 sugiere que la primera pudiera tratarse de la subunidad reguladora, R, del sistema proteína quinasa dependiente de cAMP y/ la segunda de la subunidad catalítica, C. En cabeza de insecto - adulto predominaría la forma R_2 y en larva la forma R. La enzima PQI-1, que no se inhibe por PL, pudiera tratarse de un dímero C_2 cuyas posibilidades de interacción con PL estuvieran bloqueadas. Algunos datos experimentales sugieren, sin embargo, una posible/ relación entre PQG y PQI-1, aunque no se descarta que esta enzi- ma tenga una entidad propia como proteína quinasa independiente/

de nucleótidos cíclicos. La inhibición por PL de la actividad - proteína quinasa asociada a membranas, sugiere que las enzimas - de fracción soluble y fracción particulada están relacionadas. En la FIG 96 se muestran las conexiones existentes entre los diversos componentes enzimáticos del sistema proteína quinasa.

4.25. El aumento de actividad quinásica del sobrenadante de centrifugación, SC, por efecto del tratamiento ácido y la precipitación con sulfato amónico y la disminución de la misma - conforma aumenta la cantidad de preparado enzimático en el ensayo sugiere la existencia de actividad(es) inhibidora(s) endógena(s) de proteína quinasa cuya detección se ha llevado a cabo - tanto en fracción soluble como en fracción particulada.

4.26. La actividad del inhibidor, I, presente en -- fracción soluble es termoestable y resistente a la acción de enzimas proteolíticas aunque existen indicios que sugieren que su estructura puede verse afectada por estos tratamientos.

4.27. El inhibidor, I, atraviesa membranas impermeables a sustancias de peso molecular superior a 6000 D y queda parcialmente retenido por membranas impermeables las sustancias de peso molecular superior a 1000 D por lo que se estima que su tamaño - se encuentra en este orden de magnitud.

4.28. Las características de retención de I por diversas resinas, geles y adsorbentes se pueden resumir en la siguiente tabla (el producto disuelto en agua destilada o tampón B):

<u>Resina/gel/adsorbente</u>	<u>Retención</u>
DEAE-celulosa	+
Fosfocelulosa	-
Dowex 50W x 4	+
Hidroxiapatito	-
Alúmina	+
Sephadex G-25 y G-50	+
Carbón activo	+

4.29 El inhibidor, I, presenta características de un derivado nucleotídico de adenina en cromatografías en capa fina en celulosa con el sistema butanol : acetona: acético: NH_3 5% : H_2O (70: 50:30:30:20; v/v), en cromatografías en Sephadex G-10 y en electroforesis en capa fina.

4.30. Las espectroscopías UV y de RMN permiten afirmar/ que una base púrica, posiblemente un nucleosido que pudiera tratarse de una forma desoxi, forma parte de la estructura del inhibidor I.

4.31. El análisis de aminoácidos indica la presencia - en el preparado del inhibidor de aspártico (asparagina) glutámico (glutamina), glicola y serina formando probablemente parte de una estructura peptídica con el N-terminal bloqueado.

4.32. El inhibidor, I, incide tanto sobre los distintos componentes enzimáticos del sistema proteína quinasa (FIG 96), - como sobre adenilato ciclasa y fosfoproteína fosfatasa.

293

PRODUCTOS

-Soportes cromatográficos.

Sephadex G-10 (40-120 μ), Sephadex G-25 (50-150 μ), Sephadex G-50 (50-150 μ), Sephadex G-100 (40-120 μ) y Sephadex G-200 (40-120 μ) de Pharmacia Chemicals, Uppsala (Suecia). Ultrogel AcA 22 (60-140 μ), Ultrogel AcA 44 (60-140 μ) de LKB, Stockholm (Suecia). - Biogel HTP, Dowex 50W x 4 (H^+) (200 - 400 mallas) y Dowex AG 1x4 (Cl^-) (200-400 mallas) de Bio-Rad Lab., Richmond (EE.UU). DEAE--celulosa de Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri (EE.UU). Alúmi na neutra 90 activa (G.A. -I) de Merck, Darmstadt (R.F. Alemania). Celulosa MN 300 de Macherey & Nagel Co., Düren (R.F. Alemania). - Fosfocelulosa P-11 de Whatman Ltd. Maidstone (Inglaterra).

- Productos radiactivos.

(3 - 3H) cAMP (20-30 Ci/m mol), (3 - 3H) cGMP (10-30 Ci/m mol), - ^{32}P -ortofosfato (30 - 100 Ci/mg) y (γ - ^{32}P) ATP (5000 Ci/m mol) - de The Radiochemical Centre, Amersham (Inglaterra)

- Enzimas y proteínas.

Histonas de timo de ternera tipos II-A, III-S, V, V-S, VI, VII-S, VIII-S, sulfato de protamina de esperma de salmón, libre de histonas, caseína, albúmina bovina (fracción V), citocromo c de corazón de caballo, mioglobina de cachalote, triosafofosfato isomerasa de músculo de conejo, L-glicerol - 3 - fosfato deshidrogenasa de hígado de caballo, gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo, aldolasa de músculo de conejo, tiroglutamina de tiroides bovino, glutamato deshidrogenasa de hígado bovino, α -amilasa de Bacillus subtilis, catalasa bovina, pronasa de Streptococcus griseus, proteína quinasa de corazón bovino e inhibidor de proteína quinasa de músculo esquelético de conejo de Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri (EE.UU.). Ovoalbúmina y tripsina de páncreas bovino Boehringer, Mannheim (R.F. Alemania). Las proteínas no histonas (HMG) han sido amablemente cedidas por la Dra. Consuelo Jiménez. La fosfoproteína fosfatasa parcialmente purificada de Ceratitis capitata ha sido amablemente cedida por Doña Susana Periañez Fernández.

- Otros productos y reactivos.

Filtros Whatman GF/C de Whatman Ltd, Maidstone (Inglaterra). Filtros Oxoid 0.45 μ de Oxoid Ltd., London (Inglaterra). Membranas de diálisis Visking Tubing 18/32 y 20/32 de Scientific Instrument Centre Ltd., London (Inglaterra). Membranas UM-2 y PM-30 de Amicon Co. Lexington, Mass (EE.UU.). Placas Polygram Cel 300 de Macherey & Nagel Co., Düren (R.F. Alemania). Lubrol PX, nucleótidos, nucleosidos, bases púricas y bases pirimidínicas de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (EE.UU.)

-296-

Todos los demás productos utilizados que no aparecen en esta relación son de grado reactivo de Merck, Darmstadt (R.F. Alemania) o Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (EE.UU.)

BIBLIOGRAFIA

1. BURNETT, G., KENNEDY, E. P. (1954) J. Biol. Chem., 211: 969-980
2. FRIEDKIN, M., LEHNINGER, A. L. (1949) J. Biol. Chem., 177: 775-788
3. KREBS, E. G., FISCHER, E. F. (1956) Biochim. Biophys. Acta., 20: 150-157
4. KREBS, E. G., BEAVO, J. A. (1979) Ann. Rev. Biochem., 48: 923-959
5. KREBS, E. G. (1972) Curr. Top. Cell. Regul., 5: 99-133
6. WALSH, D. A., KREBS, E. G. (1973) Enzymes., 8: 555-581
7. LANGAN, T. A. (1973) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 3: 99-153
8. RUBIN, C. S., ROSEN, O. M. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44: 831-887
9. NIMMO, H. G., COHEN, P. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 8: 145-266
10. CARLSON, G. M., BECHTEL, P. J., GRAVES, D. J. (1979) Adv. Enzymol., 50: 41-115
11. GILL, G. N., McCUNE, R. W. (1979) Curr. Top. Cell. Regul., 15: 1-46
12. RODNIGHT, R., LAVIN, B. E. (1964) Biochem. J., 93: 84-91
13. SMITH, D. L., CHEN, C. C., BRUEGGER, B. B., HOLTZ, S. L., HALPERN, R. M., SMITH, R. A. (1974) Biochemistry., 13: 3780-3785
14. RABINOWITZ, M., AND LIPMANN, F. (1960) J. Biol. Chem., 235: 1043-1050
15. LERCH, K., MUIR, L. W., FISCHER, E. H. (1975) Biochemistry., 14: 2015-2023
16. ROSEN, O. M., ERLICHMAN, J. (1975) J. Biol. Chem., 250: 7788-7794
17. GREENGARD, P. (1978) Science., 199: 146-152
18. ROQUES, M., TIRARD, L. A., DEGROOT, L. J. (1977) Endocrinology., 100: 967-973
19. KAERLEIN, M., HORAK, I. (1976) Nature., 259: 150-151
20. OCHOA, S., DE HARO, C. (1979) Ann. Rev. Biochem., 48: 549-580
21. TRACHEL, H., RANU, R. S., LONDON, I. M. (1979) Methods Enzymol., 60: 485-494
22. RANU, R. S., LONDON, I. M. (1979) Methods Enzymol., 60: 495-510

23. KUHN, H., COOK, J.H., DREYER, W.J. (1973) *Biochemistry*, 12: 2495-2502
24. FARBER, D.B., BROWN, B.M., LOLLEY, R.N. (1979) *Biochemistry*, 18: 370-378
25. BENNET, J. (1979) *Febs Lett.*, 103: 342-344
26. KUO, J.F., GREENGARD, P. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244: 3417-3419
27. MANAI, M., COZZONE, A.J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91: 819-826
28. KHANDELWAL, R.L., SPEARMAN, T.N., HAMILTON, I.R. (1973) *Febs Lett.*, 31: 246-250
29. WANG, J.Y.J., KOSHLAND, D.E. Jr (1978) *J. Biol. Chem.*, 253: 7605-7608
30. STRAND, M., AUGUST, J.T. (1971) *Nature New Biol.*, 233: 137-140
31. ROKUTANDA, M., MAEDA, Y.Y., TAKAHAMA, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88: 1322-1328
32. ALBIN, C., ROBISON, W.S. (1980) *J. Virol.*, 34: 297-302
33. TSUNG, P.-K., HERMINA, N., WEISSMAN, G. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49: 1657-1662
34. TSUZUKI, J., NEWBURG, R.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.*, 354: 101-106
35. SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. (1960) *Pharmac. Rev.*, 12: 265-299
36. WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243: 3763-3765
37. ROBINSON, C.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., (1971) "Cyclic Amp", editado por R.H. KAHN y W.E.M. Lands. Academic Press, New York
38. KUO, J.F., GREENGARD, P. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 64: 1349-1355
39. WALSH, D.A. (1978) *Biochem. Pharmacol.*, 27: 1801-1804
40. ZUBAY, G., SCHWARTZ, D., BECKWITH, J. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 66: 104-110
41. RIGGZ, A.D., REINESS, G., ZUBAY, G. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 68: 1222-1225

42. YUH, K.C., TAO, M (1974) *Biochemistry.*, 13: 5220-5226
43. UELAND, P.M., DØSKELAND, S.O. (1977) *J.Biol.Chem.*, 252: 677-686
44. TSUZUKI, J., KIGER, J.A. (1975) *Biochim.Biophys.Acta.*, 393: 225-235
45. BROSTROM, M.A., REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G. (1970) *Adv.Enzyme Regul.*, 8: 191-203
46. OGEZ, J.R., SEGEL, I.H. (1976) *J.Biol.Chem.*, 251: 4551-4556
47. SWILLENS, S., DUMONT, J.E. (1976) *J.Mol.Med.*, 1: 273-288
48. CHAU, V., ANDERSON, C., HUANG, G., HUANG, L.C. (1978) *Fed.Proc.*, 37: 1329
49. TSUZUKI, J., KIGER, J.A. (1978) *Biochemistry.*, 17: 2961-2970
50. BUILDER, S.E., BEAVO, J.A., KREBS, E.G. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255: 2350-2354
51. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G. (1975) *Adv.Cyclic.Nucleotide Res.*, 5: 241-251
52. HOFMANN, F., BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250: 7795-7801
53. ERLICHMAN, J., RUBIN, C.S., ROSEN, O.M. (1973) *J.Biol.Chem.*, 248: 7607-7609
54. RAMSEYER, J., KANSTEIN, C.B., WALTON, G.M., And GILL, G.N. -- (1976) *Biochim.Biophys.Acta.*, 446: 358-370
55. SUGDEN, P.H., HOLLADAY, L.A., REIMANN, E.M., CORBIN, J.D. -- (1976) *Biochem.J.*, 159: 409-422
56. GILL, G.N. (1977) *J.Cyclic Nucleotide Res.*, 3: 153-162
57. LINCOLN, T.M., CORBIN, J.D. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 74: 3239-3243
58. CORBIN, J.D., SUGDEN, P.H., WEST, L., FLOCKHART, D.A., LINCOLN, T.M., MCCARTHY, D. (1978) *J.Biol.Chem.*, 249: 530-535
59. TAKAI, Y., YAMAMURA, H., NISHIZUKA, Y (1974) *J.Biol.Chem.*, -- 249: 530-535
60. UNO, I., UEDA, T., GREENGARD, P. (1977) *J.Biol.Chem.*, 252: 5164-5174
61. CORBIN, J.D., SUGDEN, P.H., LINCOLN, T.M., KEELY, B.L. (1977) -- *J.Biol.Chem.*, 252: 3854-3861

62. LEE, M.Y.W., IVERSEN, R.N. (1976) *Biochim.Biophys.Acta.*, 429: 123-136
63. REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G. (1971) *J.Biol.Chem.*, -- 246: 1986-1995
64. CHEN, C.J., WALSH, D.A. (1971) *Biochemistry.*, 10: 3614-3621
65. GILL, G.N., GARREN, L.D. (1971) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 68: 786-790
66. TAO, M., HACKETT, P. (1973) *J.Biol.Chem.*, 248: 5324-5332
67. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G. (1974) *Methods Enzymol.*, 38: 299-308
68. CORBIN, J.D., KEELY, S.L., PARK, C.R. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250: 218-225
69. KUMON, A., NISHIYAMA, D., YAMAMURA, H., NISHIZUKA, Y. (1972) *J. - Biol.Chem.*, 247: 3726-3735
70. DØSKELAND, S.O., UELAND, P.M. (1975) *Int.J.Biochem.*, 6: 181-190
71. UELAND, P.M., DØSKELAND, S.O. (1976) *Biochem.J.*, 157: 117-126
72. COSTA, M., GERNER, E.W., RUSSELL, D.H. (1976) *J.Biol.Chem.*, 251: 3313-3319
73. BYUS, C.V., CHUBE, J.M., HUXTABLE, R.J., RUSSELL, D.H. (1976) *Bio-- chem.Biophys.Res.Comm.*, 73: 694-702
74. HANDSCHIN, J.C., EPPENBERGER, U. (1979) *FEBS Lett.*, 106: 301-304
75. LEE, P.C., RADLOFF, D., SCHWEPPE, J.J., JUNGMAHN, R.A. (1976) *J. - Biol.Chem.*, 251: 914-921
76. HADDOX, M.K., ROESKE, W.R., RUSSELL, D.H. (1979) *Biochim.Biophys.- Acta.*, 585: 527-534
77. HADDOX, M.K., MAGUN, B.E., RUSSELL, D.H. (1980) *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.*, 77: 3445-3449
78. HOPPE, J., WAGNER, K.G. (1977) *FEBS Lett.*, 74: 95-98
79. TAYLOR, S.S., LEE, C., SWAIN, L., STAFFORD, P.H. (1976) *Anal. Biochem.*, 76: 45-52
80. TAYLOR, S.S., STAFFORD, P.H. (1978) *J.Biol.Chem.*, 253: 2284 - 2287
81. RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J., ROSEN, O.M. (1972) *J.Biol.Chem.*, 247: 36-44

82. ZOLLER, M.J., KERLAVAGE, A.R., TAYLOR, S.S. (1979) J. Biol. Chem., 254: 2408-2412
83. POTTER, R.L., TAYLOR, S.S. (1979) J. Biol. Chem., 254: 2413-2418
84. ROSEN, O.M., RANGEL-ALDAO, R., ERLICHMAN, J. (1977) Curr. Top. - Cell. Regul., 12: 39-74
85. FLEISCHER, N., ROSEN, O.M., REICHLIN, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 54-58
86. BECHTEL, P.J., BEAVO, J.A., HOFMAN, F., DILLS, W.L., KREBS, E.G. -- (1975) Fed. Proc., 34: 617
87. BECHTEL, P.J., BEAVO, J.A., KREBS, E.G. (1977) J. Biol. Chem., -- 252: 2691-2697
88. KINZEL, V., KUBLER, D. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 71: 257-264
89. PETERS, K.S., DEMAILE, J.G., FISCHER, E.H. (1977) Biochemistry. 16: 5691-5697
90. HOPPE, J., LAWACZEK, R., RIEKE, E., WAGNER, K.G. (1978) Eur. J. -- Biochem., 90: 585-593
91. BUSS, J.E., McCUNE, R.W., GILL, G.N. (1979) J. Cyclic Nucleotide Res., 2: 225-237
92. HADDOX, M.K., NEWTON, N.E., HARTH, D.K., GOLDBERG, N.A. (1972) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 47: 653-661
93. SHIZUTA, Y., BECHTEL, P.J., BEAVO, J.A., KREBS, E.G. (1975) Adv. -- Cyclic Nucleotide Res., 2: 756
94. HOPPE, J., MARUTZKY, R., FREIST, W., WAGNER, K.G. (1977) Eur. J. Biochem., 80: 369-373
95. HOPPE, J., FREIST, W., MARUTZKY, R., SHALTIEL, S. (1978) Eur. J. Biochem., 90: 427-432
96. HOPPE, J., FREIST, W. (1979) Eur. J. Biochem., 93: 141-146
97. MATSUO, M., CHAU, L., HUANG, D., VILLAR PALASI, C. (1978) FEBS -- Lett., 87: 77-79
98. POMERANTZ, A.H., ALLFREY, V.G., MERRIFIELD, R.B., JOHNSON, E.M. - (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 4261-4265
99. SCHWECHHEIM, D., HOFMANN, F. (1977) J. Biol. Chem., 252: 7690-7696
100. ERLICHMAN, J., ROSENFELD, R., ROSEN, O.M. (1974) J. Biol. Chem., -- 251: 7526-7529

101. RANGEL-ALDAO, R., ROSEN, O.M. (1976) J. Biol. Chem., 251: 7526-7529
102. TODHUNTER, J.A., PURICH, D.L. (1977) Biochim. Biophys. Acta., --
485: 87-94
103. RANGEL-ALDAO, R., ROSEN, O.M. (1976) J. Biol. Chem., 251: 3375-3380
104. RANGEL-ALDAO, R., ROSEN, O.M. (1977) J. Biol. Chem., 252: 7140-7145
105. LIU, A.Y.C., GREENGARD, P. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73: 568-572
106. CHIU, Y.S., TAO, M. (1978) J. Biol. Chem., 253: 7145-7148
107. UNO, I., UEDA, T., GREENGARD, P. (1976) J. Biol. Chem., 251: 2192-2195
108. OWENS, J.R., HALEY, B.E. (1978) J. Supramol. Struct., 9: 57-68
109. ARMSTRONG, R.N., KAISER, E.T. (1978) Biochemistry., 17: 2840-2845
110. WITT, J.J., ROSKOSKI, R. (1975) Biochemistry., 14: 4503-4507
111. SODERLING, T.R., PARKS, C.R. (1974) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 4: 283-333
112. MOLL, G.W., KAISER, E.T. (1976) J. Biol. Chem., 251: 3993-4000
113. KOCHETKOV, S.N., BULARGINA, T.V., SASCHENKO, L.P., SEVERIN, E.W. (1977) Eur. J. Biochem., 81: 111-118
114. KOCHETKOV, S.N., BULARGINA, T.V., SASCHENKO, L.P., SEVERIN, E.S. (1976) FEBS Lett., 71: 212-214
115. MATSUO, M., HUANG, G., HUANG, L.C. (1978) Fed. Proc., 37: 1328
116. ARMSTRONG, R.N., KONDO, H., KAISER, E.T. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 722-725
117. KUO, J.F., KRUEGER, B.K., SANES, J.R., GREENGARD, P. (1970) Biochim. Biophys. Acta., 212: 79-91
118. YAMASHITA, K., FIELD, J.B. (1972) Metabolism., 21: 150-158
119. IWAI, H., INAMASU, M., TAKEYAMA, S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 46: 824-830
120. LEMAIRE, S., LABRIE, F., GAUTHIER, H. (1974) Can. J. Biochem., 52: 137-141

121. SEVERIN, E.S., SASHCHENKO, L.P., KOCHETKOV, S.N., KUROCHKIN, S.N. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 9: 171-184
122. GRANOT, J., MILDVAN, A.S., BROWN, E.M., KONDO, H., BRAMSON, H.N., -- KAISER, E.T. (1979) *FEBS Lett.*, 103: 265-269
123. NOLAN, C., NOVOA, W.B., KREBS, E.G., FISCHER, E.H. (1974) *Biochemistry.*, 3: 542-551
124. COHEN, P., WATSON, D.C., DIXON, G.H. (1975) *Eur. J. Biochem.*, 51: 79-92
125. DAILE, P., CARNEGIE, P.R. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61: 852-858
126. BYLUND, D.B., KREBS, E.G. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 6355-6361
127. KEMP, B.E., GRAVES, D.J., BENJAMINI, E., KREBS, E.G. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 4888-4894
128. SMALL, D., CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79: 341-346
129. FERAMISCO, J.R., KEMP, B.E., KREBS, E.G. (1979) *J. Biol. Chem.*, -- 254: 6987-6990
130. KEMP, B.E., BYLUND, D.B., HUANG, T.S., KREBS, E.G. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72: 3448-3452
131. SHLYAPNIKOV, S.V., ARUTYUNYAN, A.A., KUROCHKIN, S.N., MEMELOVA, L.V., NESTEROVA, M.V., SASHCHENKO, L.P., SEVERIN, E.S. (1975) -- *FEBS Lett.*, 53: 316-319
132. KEMP, B.E., BENJAMINI, E., KREBS, E.G. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73: 1038-1042
133. YEAMAN, S.J., COHEN, P., WATSON, D.C., DIXON, G.H. (1977) *Biochem. J.*, 162: 411-421
134. HUANG, T.S., KREBS, E.G. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75: 643-650
135. TURAEV, O.D., BURICHENKO, V.K. (1978) *FEBS Lett.*, 88: 59-61
136. SHENOLIKAR, S., COHEN, P. (1978) *FEBS Lett.*, 86: 92-98
137. FERAMISCO, J.R., GLASS, D.B., KREBS, E.G. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 4240-4245
138. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 3580-3583

139. KATO, I. (1979) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 570: 388-396
140. DATTA, A., De HARO, C., OCHOA, S. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. - USA.*, 75: 1148-1152
141. MILLER, T.B. Jr., LARNER, J. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 494-501
142. WALAAS, O., WALAAS, E., GRONNEROD, E. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 40: 465-477
143. LARNER, J., HUANG, L.C., BROOKER, G., MURAD, F., MILLER, T.B. -- (1974) *Fed. Proc.*, 33: 261
144. MENON, K.M.J. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 494-501
145. FRIEDMAN, Y., LANG, M., BURKE, G. (1978) *Endocrine Res. Commun.*, 5: 109-124
146. COSTA, C., KUROSAWA, A., GUIDOTTI, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. - Sci. USA.*, 73: 1058-1062
147. CASTAGNA, M., PALMER, W.K., WALSH, D.A. (1975) *Eur. J. Biochem.*, - 55: 193-199
148. KORENMAN, S.G., BHALLA, R.C., SANBORN, B.M., STEVENS, R.H. (1974) - *Science.*, 183: 430-432
149. KEELY, S.L., CORBIN, J.D., PARK, C.R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72: 1501-1504
150. WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALEZ, C., CALKINS, D., FISCHER, E.H., KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246: 1977-1985
151. DEMAILLE, J.G., PETERS, K.A., FISCHER, E.H. (1977) *Biochemistry.* 16: 3080-3086
152. DEMAILLE, J.G., PETERS, K.A., STRAND JORD, T.P., FISCHER, E.H. -- (1978) *FEBS Lett.*, 86: 113-116
153. WEBER, H., ROSEN, O.M. (1977) *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 3: 415-424
154. McPHERSON, J.M., WHITEHOUSE, S., WALSH, D.A. (1979) *Biochemistry.* 18: 4835-4844
155. FERRAZ, C., DEMAILLE, J.G. (1979) *Biochimie.*, 61: 645-651
156. ASHBY, C.D., WALSH, D.A. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247: 6637-6642
157. ASHBY, C.D., WALSH, D.A. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 1255-1261
158. WITT, J.J., ROSKOSKI, R. Jr (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 201: 36-43

159. DEMAILLE, J.G., FERRAZ, C., FISCHER, E.H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.*, 586: 374-386
160. GILL, G.N., HOLDY, K.E., WALTON, G.M., KANSTEIN, C.B. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73: 3918-3922
161. TAKAI, Y., NAKAYA, S., INOUE, M., KISHIMOTO, A., NISHIYAMA, H., NISHIZUKA, Y. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251: 1481-1487
162. TRAUGH, J.A., ASHBY, C.D., WALSH, D.A. (1974) *Methods Enzymol.*, 38C: 290-299
163. WALSH, D.A., ASHBY, C.D. (1973) *Recent Progr. Horm. Res.*, 29: 329-359
164. KUO, J.F. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 1214-1220
165. COSTA, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78: 1311-1318
166. SZMIGIELSKI, A., GUIDOTTI, A., COSTA, E. (1977) *J. Biol. Chem.*, -- 252: 3848-3853
167. KUO, W.N., LUNBY, D. (1979) *Microbios Lett.*, 10: 133-139
168. BEALE, E.G., DEDMAN, J.R., MEANS, A.R. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 6322-6327
169. TAO, M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 50-51
170. SHIMOYAMA, M., KAWAI, M., YANAMOTO, S., IWAY, H., KITANURA, A., --
"ASU, S., DOMI, R., UEDA, I. (1975) *Life Sci.*, 17: 1445-1450
171. HOCHMAN, J. (1978) *Life Sci.*, 22: 1481-1484
172. BACHRACH, V., BENALAL, D., RECHES, A. (1979) *Life Sci.*, 25: 1879-1884
173. HOOK, V.Y.H., LEE, N.M., LOH, H.H. (1980) *J. Neurochem.*, 34: 1274-1279
174. CLOUET, D.H., OCALLAGHAN, J.P. (1979) *Adv. Biochem. Psychopharma--*
col., 20: 281-300
175. WRAY, H.L., HARRIS, A.W. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, --
53: 291-294
176. KANAMORI, T., HAYAKAWA, T., NAGATSU, T. (1974) *Biochem. Biophys. --*
Res. Commun., 57: 394-398
177. KANAMORI, T., HAYAKAWA, T., NAGATSU, T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.*, 429: 147-162

178. McCLUNY, M., MILLER, J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76: 910-916
179. PILLION, D. J., LEIBACH, F. H., ROCHA, H., VON TERSCH, J. F., MENDI--CINO, J. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 79: 73-83
180. HARRY, P., PINES, M., APPLEBAUM, S. U. (1978) *Arch. Biochem. Bio--phys.*, 191: 325-330
181. KANTOR, H. S., HAMPTON, M. (1978) *Nature.*, 276: 841-842
182. CATALAN, R. E., ARAGONES, M. D., MARTINEZ, A. M., ARMIJO, M., PIÑA, M. (1980) *Eur. J. Pharmacol.*, 63: 187-190
183. IWAI, H. (1974) *J. Biochem. (TOKYO)*, 76: 419-429
184. GLAZER, R. I., KUO, J. F. (1977) *Biochem. Pharmacol.*, 26: 1287-1290
185. LEGRAVEREND, M., GLAZER, R. I. (1980) *Mol. Pharmacol.*, 14: 1130--1135
186. WITT, J. J., ROSKOSKI, R. Jr. (1980) *Biochemistry.*, 19: 143-148
187. GOLBERG, N. D., HADDOX, M. K. (1977) *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 823-896
188. KUO, J. F., GREENGARD, P. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245: 2493-2498
189. KUO, J. F., WYATT, G. R., GREENGARD, P. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246: 7159-7167
190. KUO, J. F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 4037-4041
191. HOFMANN, F., SOLD, G. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49: 1100-1107
192. TAKAI, Y., NISHIYAMA, K., YAMAMURA, H., NISHIZUKA, Y. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 4690-4695
193. KUO, J. L., KUO, W. N., SHOJI, M., DAVIS, C. W., SEERY, V. L., DONNELLY, T. E. Jr. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251: 1759-1766
194. KUO, J. F., PATRICK, J. G., SEERY, V. L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72: 996-1002
195. SHOJI, M., PATRICK, J. G., DAVIS, C. W., KUO, J. F. (1977) *Biochem. J.*, 161: 213-221
196. SHOJI, M., PATRICK, J. G., DAVIS, C. W., KUO, J. F. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 4347-4353
197. GILL, G. N., WALTON, G. M., SPERRY, P. J. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 6443-6449

198. LINCOLN, T.M., FLOCKHART, D.A., CORBIN, J.D. (1978) J. Biol. -- Chem., 253: 6002-6009
199. LINCOLN, T.M., DILLS, W.L.I., JR., CORBIN, J.D. (1977) J. Biol. Chem., 252: 4269-4275
200. FLOCKERZI, U., SPEICHEMANN, N., HOFMANN, F. (1978) J. Biol. Chem., 253: 3395-3399
201. VAN LEEMPUT-COUTREZ, M., CAMUS, J., CRISTOPHE, J. (1973) Biochem., Biophys. Res. Commun., 54: 182-190
202. MIYAMOTO, E., PETZOLD, G.L., KUO, J.F., GREENGARD, P. (1973) J. Biol. Chem., 248: 179-189
203. KUO, J.F., MIYAMOTO, E., REYES, P. (1974) Biochem. Pharmacol., 23: 2011-2021
204. INOUE, M., KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., NISHIZUKA, Y. (1976) J. Biol. - Chem., 251: 4476-4478
205. ISHIKAWA, E., ISHIKAWA, S., DAVIS, J.W., SUTHERLAND, E.W. (1969) - J. Biol. Chem., 244: 6371-6376
206. TAKAHASHI, S.Y. (1976) Insect. Biochem., 6: 519-523
207. KUO, J.F., LEE, T.P., REYES, P.L., WALTON, K.G., DONNELLY, T.E. JR., GREENGARD, P. (1972) J. Biol. Chem., 247: 16-22
208. KUO, J.F. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72: 2256-2259
209. KUO, J.F., KUO, W-N., SHOJI, M. (1976) Adv. Biochem. Psychopharmacol., 15: 379-389
210. KUO, J.F., MALVEAUX, E.J., PATRICK, J.G., DAVIS, C.W., KUO, W-N., PRUITT, A.W. (1977) Biochim. Biophys. Acta., 497: 785-796
211. WALTER, U., MILLER, P., WILSON, F., MENKES, D., GREENGARD, P. (1980) J. Biol. Chem., 255: 3757-3762
212. SOLD, G., HOFMANN, F. (1974) Eur. J. Biochem., 44: 143-149
213. GIL, G.N., KANSTEIN, C.B. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 63: 1113-1122
214. LINCOLN, T.M., HALL, C.L., PARK, C.R., CORBIN, J.D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73: 2559-2563
215. McCUNE, R.W., GILL, G.M. (1979) J. Biol. Chem., 254: 5083-5091
216. KHOO, J.C., GILL, G.N. (1979) Biochim. Biophys. Acta., 584: 21-32
217. GILL, G.N., WALTON, G.M. (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 10: 93-106

218. BLUMENTHAL, D.K., STULL, J.T., GILL, G.N. (1978) J. Biol. Chem., 253: 334-336
219. EDLUND, B., ZETTERQUIST, O., RAGNARSSON, U., ENGSTROM, L. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 79: 139-144
220. GLASS, D.B., KREBS, E.G. (1978) Fed. Proc., 37: 1329
221. YAMAMOTO, M., TAKAI, Y., HASHIMOTO, E., NISHIZUKA, Y. (1977) J. Biochem., 81: 1857-1862
222. HASHIMOTO, E., TAKEDA, M., NISHIZUKA, Y., HAMANA, K., IWAI, K. (1976) J. Biol. Chem., 251: 6287-6293
223. NISHIZUKA, Y., TAKAI, Y., HASHIMOTO, E., KISHIMOTO, A., KURODA, Y., SAKAI, K., YAMAMURA, H. (1979) Mol. Cell. Biochem., 23: 153-165
224. ENGLAND, P.J. (1976) Biochem. J., 100: 295-304
225. CASNELLIE, J.E., GREENGARD, P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71: 1891-1895
226. SCHLICHTER, D.J., CASNELLIE, J.E., GREENGARD, P. (1978) Nature., 273: 61-62
227. DE JONGE, H.R. (1976) Nature., 262: 590-593
228. CASNELLIE, J.E., IVES, H.E., JAMIESON, J.D., GREENGARD, P. (1980) J. Biol. Chem., 255: 3770-3776
229. IVES, H.E., CASNELLIE, J.E., GREENGARD, P., JAMIESON, J.D. (1980) J. Biol. Chem., 255: 3777-3785
230. DE JONGE, H.R., ROSEN, O.M. (1977) J. Biol. Chem., 252: 2780-2783
231. GEAHLEN, R.L., KREBS, E.G. (1980) J. Biol. Chem., 255: 1164-1169
232. DONNELLY, T.E., JR., KUO, J.F., REYES, P.L., LIU, Y-P., GREENGARD, P. (1973) J. Biol. Chem., 248: 190-198
233. KUO, W-N., SHOJI, M., KUO, J.F. (1976) Biochim. Biophys. Acta., 437: 142-149
234. KUO, W-N., KUO, J.F. (1976) J. Biol. Chem., 251: 4283-4286
235. SHOJI, J., BRACKETT, N.L., TSE, J., SHAPIRA, R., KUO, J.F. (1978) J. Biol. Chem., 253: 3427-3434
236. WALTON, G.M., GILL, G.N. (1980) J. Biol. Chem., 255: 1603-1609
237. KUO, J.F., KUO, W-N., SHOJI, M. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 9: 199-207

238. MACKENZIE, C.W., DONNELLY, T.E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88: 462-469
239. KUO, J.F. (1978) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18: 341-355
240. KUO, W.-N., WILLIAMS, J.L., LUNDY, D., FLOYD-JONES, T. (1978) *Microbios Lett.*, 7: 133-138
241. KUO, W.-N., WILLIAMS, J.L., FLOYD-JONES, T., DUGGANS, C.F., BOONE, D. L., SMITH, S.O., COPELAND, R.F. (1979) *Experientia*, 35: 997-998
242. JUHL, H., ESMANN, V. (1979) *Mol. Cell. Biochem.*, 26: 3-18
243. BLUM, H.E., POCINWONG, S., FISCHER, E.H. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 2198-2202
244. HIRSCH, J., MARTELO, O. (1978) *Biochem. J.*, 169: 355-359
245. MARAGOUidakis, M., HANKIN, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, 480: 122-136
246. GOLD, M.H., SEGEL, I.H. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 2417-2423
247. ISSINGER, O.G. (1977) *Biochem. J.*, 165: 511-518
248. GOLDSTEIN, J.L., HASTY, M.A. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 6300-6307
249. HOSEY, N.M., TAO, M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, 482: 348-357
250. HATHAWAY, G.M., TRAUGH, J.A. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 762-768
251. DEBAUVALLE, M.C., MEGGIO, F., CREUZET, C., LOEB, J.E. (1979) *FEBS -- Lett.*, 107: 193-196
252. JOOS, T., ANDERER, F.A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87: 757-763
253. KUO, J.F. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 1755-1759
254. KEMP, B.E., FROSCIO, M., ROGERS, A., MURRAY, A.W. (1975) *Biochem. J.*, 145: 241-249
255. KUMAR, R., TAO, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.*, 410: 87-98
256. MUROFUSHI, H. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.*, 364: 260-271
257. DAHMUS, M.E., NATZLE, J. (1977) *Biochemistry*, 16: 1901-1908
258. THORNBURG, W., LINDELL, T.J. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252: 6660-6665
259. MANSON, W., CAROLAN, T., ANNAN, W.D. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 78: 411-417

260. MEGGIO, F., DONELLA-DEANA, A., PINNA, L.A. (1978) FEBS Lett., 91: 216-221
261. PINNA, L.A., DONELLA-DEANA, A., MEGGIO, F. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 87: 114-120
262. KISH, V.M., KLEINSMITH, L.J. (1974) J. Biol. Chem., 249: 750-760
263. JOB, D., COCHET, C., PIROLLET, F., CHAMBAZ, E.M. (1979) FEBS Lett., 98: 303-307
264. YAMAMOTO, M., CRISS, E.W., TAKAI, Y., YAMAMURA, H., NISHIZUKA (1979) J. Biol. Chem., 254: 5049-5052
265. IWAI, H., SHIMOYAMA, H., YAMAMOTO, S., TANIGAWA, Y., UEDA, I. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 66: 856-862
266. KURODA, Y., HASHIMOTO, E., NISHIZUKA, Y. (1977) J. Biochem., 82: 1167-1172
267. MÄENPÄÄ, P.H. (1977) Biochim. Biophys. Acta., 498: 294-305
268. WALINDER, O. (1973) Biochim. Biophys. Acta., 293: 140-149
269. THORNBURG, W. (1979) Biochim. Biophys. Acta., 571: 35-44
270. SILBERSTEIN, H., AUGUST, J.T. (1976) J. Biol. Chem., 251: 3176-3184
271. TSIAPALIS, C.M. (1977) Nature., 266: 27-30
272. ERIKSON, R.L., COLLET, M.S., ERIKSON, E., PURCHIO, A.F. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76: 6260-6264
273. MEYER, W.L., FISCHER, E.H., KREBS, E.G. (1964) Biochemistry., 3: 1033-1039
274. DABROWSKA, R., SHERRY, J.M.F., AROMATORIO, D.K., HARTSHORNE, D.J. (1978) Biochemistry., 17: 253-258
275. YAGI, K., YAZAKAWA, M., KAKIUCHI, S., OHSHIMA, M., UENISHI, K. (1978) J. Biol. Chem., 253: 1338-1340
276. PIERES, E., PERRY, S.V., THOMAS, M.A.W. (1974) FEBS Lett., 41: 292-296
277. WAISMAN, D.M., SINGH, T.J., WANG, J.H. (1978) J. Biol. Chem., 253: 3387-3390
278. COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J.G., COHEN, P.T.W., VANAMAN, T.C., NAIRN, A.C. (1978) FEBS Lett., 92: 287-293
279. SCHULMAN, H., GREENGARD, P. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 5432-5436

280. LANDT, M., McDONALD, J. M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93: 881-888
281. TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., IWASA, Y., KAWAHARA, Y., MORI, T., NISHIZUKA, Y. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 3692-3695
282. TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., KIKKAWA, U., MORI, T., NISHIZUKA, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91: 1218-1224
283. KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., MORI, T., KIKKAWA, U., NISHIZUKA, Y. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 2273-2276
284. BAGLIONI, C. (1979) *Cell*, 17: 225-264
285. FARELL, P. J., BALKOW, J., HUNT, T., JACKSON, R. J., TRACHEL, H. (1977) *Cell*, 11: 187-200
286. RANU, R. S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91: 1437-1444
287. SEN, C. G., TAIRA, H., LENGYEL, P. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253: 5915-5921
288. KIMCHI, A., ZILBERSTEIN, A., SCHMIDT, A., SHULMAN, L., REVEL, M. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 9846-9853
289. LEVIN, D. H., LONDON, I. M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1121-1125
290. PETRYSHYN, R., LEVIN, D. H., LONDON, I. M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94: 1190-1198
291. MINKS, M. A., WEST, D. A., BENVIN, S., BAGLIONI, C. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 10180-10183
292. DENLINGER, D. L. (1978) En: *Molecular Biology and Pharmacology Of Cyclic Nucleotides*, Editado por G. Folco y R. Paoletti, pp: 319-322. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam y New York.
293. FRAENKEL, G., BLECHL, A., BLECHL, J., HERMAN, P., SELIGMAN, M. I. -- (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2182-2186
294. DENLINGER, D. L., CHAUDHURY, M. F. B., DHADIALLA, T. S. (1978) *Experientia*, 34: 1296-1297
295. DELACHAMBRE, J., DELBECQUE, J. P., PROVANSAL, A., DE REGGI, M. L., - CAILLA, H. (1979) *Experientia*, 35: 701-702
296. TAYLOR, D. P., NEWBURG, R. W. (1978) En: *Molecular Biology and Pharmacology Of Cyclic Nucleotides*, editado por: G. Folco y R. Paoletti, pp: 323-325. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam y New York.

297. DELINGER, D.L., WINGARD, P. (1978) *Insect Physiol.*, 24: 715-719
298. FALLON, A.M., WYATT, G.R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.*, 411: 173-185
299. ALBIN, E.E., NEWBURG, R.W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.*, 377: 389-401
300. TAKAHASHI, S.Y., HANAOKA, K. (1977) *Insect Biochem.*, 7: 133-139
301. TAKAHASHI, S.Y., KAGEYAMA, T., OHOKA, T., OHNISHI, E. (1974) *Insect Biochem.*, 4: 429-438
302. TAKAHASHI, S.Y., OHOKA, T., HANAOKA, K., KAGEYAMA, T., OHNISHI, E. (1975) *Develop. Growth. Diff.*, 17: 227-235
303. NISHIYAMA, K., KATAKAMI, H., YAMAMURA, H., TAKAI, Y., SHIMOMURA, R., NISHIZUKA, Y. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 1297-1300
304. ROCHETTE-EGLY, C., CASTAGNA, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.*, 526: 107-115
305. PINES, M., APPLEBAUM, S.W. (1978) *Insect Biochem.*, 8: 183-187
306. VEDECKIS, W.V., GILBERT, L.I. (1973) *J. Insect Physiol.*, 19: 2445-2457
307. DE REGGI, M.L., CAILLA, H.L. (1975) *J. Insect Physiol.*, 21: 1671-1674
308. CATALÁN, R.E., VILA, T., CASTILLON, M.P. (1976) *Experientia.*, 32: 843-844
309. CATALÁN, R.E., CASTILLÓN, M.P., MUNICIO, A.M. (1976) *Biochem. - Biophys. Res. Commun.*, 72: 184-189
310. CASTILLÓN, M.P., CATALAN, R.E., MUNICIO, A.M. (1973) *FEBS Lett.*, 32: 113-115
311. CATALAN, R.E., CASTILLON, M.P., MUNICIO, A.M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 385-391
312. CATALAN, R.E., CASTILLON, M.P., MUNICIO, A.M. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69: 914-919
313. CATALÁN, R.E., MUNICIO, A.M. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61: 1394-1399
314. CATALAN, R.E., CASTILLON, M.P., GARCIA, J.L., HARO, A., PERIAÑEZ, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89: 800-805
315. FERNANDEZ-SOUSA, J.M., MUNICIO, A.M., RIBERA, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*, 231: 527-534

316. CATALAN, R., MUNICIO, A.M. (1965) *Nature.*, 208: 1227-1228
317. ANDERSON, W.B., SCHNEIDER, A.B., EMMER, M., PERLMAN, R.L., PASTAN, I. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246: 5929-5937
318. SUN, Y.I., SHAPIRO, L., ROSEN, O.M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 6181-6184
319. MAENO, H., GREENGARD, P. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247: 3269-3277
320. KHANDELWAL, R.J., VANDENHEEDE, J.R., KREBS, E.G. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251: 4850-4858
321. RODBELL, M., KRYSHNA, G. (1974) *Methods Enzymol.*, 31A: 103-107
322. MIYAMOTO, E., KUO, J.F., GREENGARD, P. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244: 6395-6402
323. DAYHOFF, M.O. (1973) En: "Atlas of Protein Sequence and Structure" Vol. 5. (National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md)
324. SOBER, H.A. (1968) En: Handbook of Biochemistry. Selected -- Data for Molecular Biology (The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio)
325. CORRAN, P.H., WALEY, S.G. (1975) *Biochem. J.*, 145: 335-344
326. FONDY, T.P., ROSS, C.R., SOLLOHUB, S.J. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244: 1631-1644
327. VAN EYS, J., JUDD, J., FORD, J., WOMACK, W.B. (1964) *Biochemistry.*, 3: 1755-1763
328. LAI, C.Y., NAKAI, N., CHANG, D. (1974) *Science*, 183: 1204-1206
329. APPELLA, E., TOMKINS, G.M. (1966) *J. Mol. Biol.*, 18: 77-89
330. EDELHOCH, H., de CROMBRUGGHE, B. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241: 4357-4365
331. KAKIUCHI, K., HAMAGUCHI, K., ISEMURA, T., *J. Biochem. (TOKYO)*, 57: 167-164
332. ROSS E., SCHAFTZ, C. (1973) *Anal. Biochem.*, 54: 304-306
333. DULLEY, J.R., GRIEVE, P.A. (1975) *Anal. Biochem.*, 64: 136-141
334. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275

335. CHERRINGTON, A.D., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C., CORBIN, J.D., PARK, C.R., EXTON, J.H. (1976) J. Biol. Chem., 251: 5209-5218
336. SACKTOR, B., BALAKIR, R.A., FILBURN, C.R. (1977) Arch. Biochem. Biophys., 184: 391-399
337. MOLL, G.W. Jr., KAISER, E.T. (1977) J. Biol. Chem., 252: 3007-3011
338. HUANG, L.C., HUANG, C. (1975) Biochemistry., 14: 18-24
339. DREYFUSS, G., SCHWARTZ, K.J., BLOUT, E.R. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 12: 5926-5930
340. GEORGE, E.R., BALAKIR, R.A., FILBURN, C.R., SACKTOR, B. (1977) Arch. Biochem. Biophys., 180: 429-443
341. BOIVIN, P., GALAND, C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun., 81: 473-480
342. HOSEY, M., TAO, M. (1977) Biochemistry., 16: 4578-4583
343. UEDA, T., RUDOLPH, S.A., GREENGARD, P. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 170: 492-503
344. JERGIL, B., OHLSSON, R. (1974) Eur. J. Biochem., 46: 13-25
345. RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J., ROSEN, O.M. (1972) J. Biol. Chem., 247: 6135-6139
346. AZHAR, S., MENON, K.M.J. (1975) Biochem. J., 151: 23-26
347. KRALL, J.F., SCHLINDER, A.M., LORENMAN, S.G. (1978) Arch. Biochem. Biophys., 187: 1-11
348. KRALL, J.F., LORENMAN, S. (1980) Arch. Biochem. Biophys., 199: 479-487
349. DERUBERTIS, F.R., CRAVEN, P.A. (1976) J. Clin. Invest., 57: 1442-1450
350. JONES, G.M., MAC NEIL, S., MARTIN, T.J. (1979) Biochim. Biophys. Acta., 582: 504-514
351. GARCIA, J.L. (1980) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
352. SALOMON, Y., LONDOS, C., RODBELL, M. (1974) Anal. Biochem., 58: 541-548
353. SAHYOUN, N., SCHMITGES, C.J., SIEGEL, M.I., CUATRECASAS, P. (1979) Life Sci., 19: 1961-1970
354. SAHYOUN, N., SCHMITGES, C.J., SIEGEL, M.I., CUATRECASAS, P. (1979) Life Sci., 19: 1971-1980

